

Franz Grabisch

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR
PATHOGENESE ERWORBENER
NICHT-IMMUNOLOGISCHER HÄMOLYTISCHER ANÄMIEN

Frankfurt am Main 1962

Aus der I. Medizinischen Universitätsklinik
Frankfurt am Main (Direktor: Prof. Dr. F. H o f f)

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR PATHOGENESE
ERWORBENER NICHT-IMMUNOLOGISCHER
HÄMOLYTISCHER ANÄMIEN.

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde

Der Hohen Medizinischen Fakultät der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von

F r a n z G r a b i s c h
aus
Karbischau (Oberschlesien)



Referent: Prof. Dr. med. H. Fischer

Korreferent: Prof. Dr. med. J. Frey

Dekan: Prof. Dr. med. K. Herzberg

Tag der mündlichen Prüfung: 6. April 1962

Inhaltsverzeichnis.

A. Einleitung und Problemstellung.

B. Methoden:

- 1) Bestimmung der Lebensdauer transfundierter Erythrozyten:
 - a) mit Hilfe der Differential-Agglutination;
 - b) mit Hilfe von radio-aktivem Chrom⁵¹.
- 2) Kreuztest zum Nachweis der gesteigerten Hämolyse.
- 3) Bestimmung von Enzym-Aktivitäten der Erythrozyten:
 - a) Katalase;
 - b) Hämoglobin-Reduktasen.

C. Ergebnisse:

- 1) Nachweis der gesteigerten Hämolyse:
 - a) mit der A s h b y - Technik;
 - b) mit der Radiochrom - Technik.
- 2) Kreuztest.
- 3) Enzym - Studien an Erythrozyten:
 - a) urämischer Patienten;
 - b) leukämischer Patienten;
 - c) in Modellversuchen nach Vorbehandlung.
- 4) Versuche zur Beeinflussung der gesteigerten Cytolyse:
 - a) Verzögerung der Lyse von in vitro vorgeschädigten Erythrozyten durch Purin-Nucleoside;

- b) Beeinflussung der Enzym - Aktivitäten:
 - aa) vorbehandelter Erythrozyten;
 - bb) Erythrozyten urämischer Patienten.
- c) Verzögerung der gesteigerten Hämolyse von
in vivo vorgeschädigten Erythrozyten durch
Inosin.

D. Diskussion der Ergebnisse.

E. Zusammenfassung.

Literaturverzeichnis.

Lebenslauf.

E i n l e i t u n g .

Im älteren Schrifttum der Pathologen finden sich wiederholt Hinweise darauf, daß frisches Blutserum gewebsschädigend wirkt. (E p p i n g e r, R ö s s l e, T e r b r ü g g e n, L e t t e r e r, S c h ü r m a n n, M a s s h o f f). T e r b r ü g g e n zum Beispiel konnte vor etwa 25 Jahren nachweisen, daß kleine Gewebstückchen aus Kaninchenleber, -herz und -niere ganz erheblich geschädigt werden, wenn man sie in frischem, nativen Serum des gleichen Tieres inkubiert, daß die Nekrolyse dagegen ausbleibt, wenn man das Serum vorher auf 56° C erhitzt, also inaktiviert.

In neuester Zeit haben F i s c h e r, F r i t z s c h e und A r g e n t o n diese Untersuchungen aufgegriffen und nachgewiesen, daß es sich bei der Schädigung der Zellen um einen Vorgang handelt, an dem Komplement und das von L. P i l l e m e r und Mitarbeitern erstmals im Jahre 1954 beschriebene Properdin zumindest mitbeteiligt sind. Sie konnten zunächst an Erythrozyten gesunder Versuchspersonen zeigen, daß diese im Serum des gleichen Spenders aufgelöst werden, wenn man sie 10 - 20 Stunden bei 37° C inkubiert. Entzieht man dem Serum Properdin, eine der vier Komplement-Komponenten oder Mg^{++} -Ionen, so unterbleibt die Lyse oder läßt sich bei weitem nicht in dem Grade erzeugen, wie sie im aktiven Serum erfolgt. Indirekt wurde damit gezeigt, daß Properdin, Komplement und Mg^{++} -Ionen für diese Lyse wichtig sind. Es wurde auch

restgestellt, daß tatsächlich im Verlauf der Inkubation mit Erythrozyten Komplement und Properdin verbraucht werden. Ähnliches gilt auch für Leber-Zellen, myeloische Leukozyten, HeLa-Zellen und andere Gewebe. Nur ist hier der Nachweis der Schädigung und besonders der Komplementbeteiligung schwieriger zu führen (F i s c h e r und F r i t z s c h e).

Es erhebt sich nun die Frage, ob solche in vitro-Versuche, die unter recht unphysiologischen Verhältnissen durchgeführt werden, auch für Zustände in vivo von Bedeutung sind, mit anderen Worten: ob die unspezifische, properdin-komplement-abhängige Lyse auch im Organismus eine Rolle spielt. F i s c h e r, F r i t z s c h e und A r g e n t o n vermuten, daß auch normale Zellen unter Bedingungen, wie sie im Organismus unter physiologischen und patho-physiologischen Verhältnissen auftreten können, unter Mithilfe des Properdin-Systems zerstört werden. In erster Linie muß dabei an die Mauserung gealterter Blutzellen, aber auch an die Lyse geschädigter Erythrozyten gedacht werden.

Vor allem aber die Tatsache, daß jede Art von Zellschädigung - zum Beispiel Vorbehandlung der Erythrozyten mit proteolytischen Fermenten, mit polypeptidartigen Eiweißspaltprodukten (Fibrinolyse-Spaltprodukten), mit Zellkernsubstanzen oder mit Polysaccharid-Komplexen - diese zellauflösende Wirkung im Reagenz-Glas verstärkte, scheint den Verfassern ein wichtiges Argument für die

mögliche Bedeutung in vivo zu sein.

Gerade dieser letzte Befund ist in der Tat besonders geeignet, die gedankliche Brücke zu den Verhältnissen bei den Kranken zu schlagen: wenn nämlich leicht und mehr oder weniger unspezifisch geschädigte Zellen, zum Beispiel Erythrozyten vorzeitig und verstärkt aufgelöst werden, so würde das auf den Menschen übertragen zu einer unspezifischen hämolytischen Anämie führen. Solche Anämien gibt es. Sie kommen häufiger vor, als man bis vor kurzem ahnte, bei Leukämien (Berlin, Böttner und Schlegel, Brown, Elliot und Young, Ross, Crockett und Emerson, Wasserman und Mitarbeiter, Morenz und Keitel, Oettingen und Kindler, Lambers und Kloss), Karzinosen (Hymann), Lymphogranulomatose (Singer, Hennemann, Jensen, Giannopoulos und Bergsagel), bei exsudativen Phthisen (Böttner und Schlegel, Miescher, Gsell und Fust) und in den späteren Stadien der Niereninsuffizienz (Becher, Vogel, Bock, Böttner und Schlegel, Gormsen und Gjølrup, Emerson und Burrows, Deutsch, Fischer und Frischau), also bei Erkrankungen, denen gemeinsam ist, daß ein erhöhter Zell- und Gewebszerfall stattfindet.

Diese Anämien sind in ihrer Pathogenese recht

ungeklärt. Der Grund, weshalb man bisher die hämolytische Komponente bei der Entstehung dieser Anämien übersah, liegt darin, daß klinisch manifeste Zeichen einer typischen hämolytischen Anämie wie die verminderte osmotische Resistenz, der Ikterus, Urobilinogenurie, stark erhöhte Reticulozytenwerte, Hyperbilirubinämie u. s. w. in diesen Fällen häufig oder sogar meistens fehlen, daß außerdem keine spezifischen, gegen die Erythrozyten gerichtete Antikörper nachgewiesen werden können und daß häufig auch die zweifellos zum gleichen Zeitpunkt vorhandenen, ebenfalls zur Anämie führenden Ursachen wie Verdrängung des Knochenmarks durch die leukämischen Infiltrationen, Blutverluste oder Eisenmangel in den Vordergrund gerückt wurden.

Die Bedeutung der gesteigerten Hämolyse für anämische Zustände bei den erwähnten Krankheiten ist erst in den letzten Jahren erkannt worden. Niedrig bleibende Hämoglobin-Werte trotz mehrfacher Blutübertragungen machen in solchen Fällen auf vermehrten Erythrozyten-Abbau aufmerksam. Aber kein Ikterus mit überwiegend "indirekter" v. d. B e r g h' scher Reaktion zeigt den vor sich gehenden Abbau der transfundierten roten Blutkörperchen an. Man gießt Erythrozyten in ein offenes System, ohne zu wissen, was mit dem roten Blutfarbstoff geschieht. F. H o f f hat das Syndrom - nach den Töchtern des Danaos in der griechischen Mythologie, die als Strafe der Götter für den begangenen Gattenmord in der

Unterwelt Wasser in ein Faß mit durchlöcherter Boden schöpfen mußten - treffend als "Danaidenphänomen" bezeichnet.

Erst durch Bestimmung der Überlebenszeit übertragener markierter Erythrozyten ließ sich der beschleunigte Zellabbau feststellen.

Meine Aufgabe sollte es sein, durch weitere Versuche zu klären, inwieweit die in Modellversuchen gewonnene Arbeitshypothese tatsächlich für in der Klinik beobachtete Fälle von erworbener, unspezifischer, hämolytischer Anämie zutrifft. Darüber hinaus war mir die Aufgabe gestellt, in weiteren Modellversuchen den Mechanismus der Schädigung der Erythrozyten und Möglichkeiten ihrer Verhütung zu untersuchen.

Methoden.

1. Bestimmung der Lebensdauer transfundierter Erythrozyten:

Schon in der Einleitung wurde darauf hingewiesen, daß die hämolytische Komponente der Anämien bei Leukämien, bösartigen Tumoren und nach deren Bestrahlung sowie bei chronischer Niereninsuffizienz nicht immer durch die üblichen klinischen Methoden demonstriert werden kann. Da aber alle hämolytischen Erkrankungen mit einer mehr oder weniger deutlich ausgeprägten Verkürzung der Erythrozyten-Lebensdauer einhergehen, ist deren Bestimmung für die Diagnose besonders wichtig.

Verschiedene Möglichkeiten stehen für die Bestimmung der Erythrozyten-Lebenszeit zur Verfügung: einmal der indirekte Weg durch Berechnung des Erythrozyten-Umsatzes durch Bestimmung der Exkretion von Endprodukten des Hämoglobin-Abbaus, zum anderen direkt und genauer durch Bestimmung der Überlebenszeit von Erythrozyten, entweder serologisch unterscheidbarer, aber kompatibler Fremd-Erythrozyten oder mit radioaktiven Isotopen markierter Eigen-Erythrozyten. Den direkten Methoden ist in jedem Falle der Vorzug zu geben.

a) Bestimmung mit Hilfe der Differential-Agglutination
nach A s h b y:

Prinzip:

Einem Empfänger wird serologisch unterscheidbares, aber verträgliches Blut eines gesunden Spenders übertragen. Nach erfolgter Transfusion zirkulieren in den Gefäßen des Empfängers zwei unterschiedliche Erythrozyten-Populationen, die sich unter Verwendung von Testseren mit spezifischen Agglutininen wieder trennen lassen. In einer aus der Cubitalvene entnommenen Blutprobe werden die Erythrozyten des Empfängers zur Agglutination gebracht. Die Erythrozyten des Spenders dagegen bleiben in Suspension und können zahlenmäßig (Zählkammer) ermittelt werden. Fortlaufende Kontrollen über längere Zeit erlauben, das allmähliche Verschwinden der Spenderzellen aus der Blutbahn des Empfängers zu verfolgen und ihre maximale Lebensdauer zu bestimmen.

Ausführung (Modifikation nach D e n s t e d t):

Praktisch gehen wir dabei so vor, daß wir dem Patienten - mit der Blutgruppe O, Rh, MN als Beispiel - das Erythrozyten-Konzentrat von 1 000 ccm Blut eines gesunden Spenders mit der Blutgruppe O, Rh, M übertragen. Nach vollständiger Durchmischung und gleichmäßiger Verteilung der beiden unterschiedlichen Erythrozyten-Arten, wofür wir eine Zeit von vier Stunden nach beendeter Transfusion abwarten, entnehmen wir aus der Vene des Empfängers eine Blutprobe, um darin die vorhandenen Spender-Erythrozyten zu zählen und ihre Anzahl gleich 100 % zu setzen.

Zu diesem Zweck wird in Doppelbestimmungen durch Zugabe von 1/10 des Volumens an Na-Zitrat-Lösung ungerinnbar gemachtes Blut in Leukozyten-Pipetten bis zur Marke 0,5 aufgezogen und mit isotonischer NaCl-Lösung bis zur Marke 11 verdünnt. Der Inhalt der Pipetten wird in saubere Wa-Röhrchen geblasen, in frischen Leukozyten-Pipetten bis zur Marke 1,0 aufgezogen und bis zur Marke 11 mit agglutinierendem Serum - in diesem Falle mit Anti-N-Serum - verdünnt. Dabei agglutinieren die MN-Blutkörperchen des Empfängers, während die M-Erythrozyten des Spenders nachher als freie Zellen in der Zählkammer gezählt werden können.

Der Inhalt der Pipette wird wiederum in ein sauberes Wa-Röhrchen ausgeblasen und etwa 45 Minuten lang in einer Schüttelmaschine geschüttelt. Anschließend läßt man die Suspension sich genau 5 Sekunden lang setzen, nimmt die überstehende Suspension mit einer Tropfpipette auf und beschickt die beiden Hälften einer Zählkammer aus verschiedenen Röhrchen. Es werden die inagglutinierten Zellen einer ganzen Thoma-Zählkammer gezählt und mit einem Faktor vervielfacht.

In fortgesetzten Kontrollen über Wochen wird die Anzahl der freien Spender-Erythrozyten bestimmt und in Beziehung gesetzt zu der Anzahl sofort nach der Transfusion. Aus einer graphischen Darstellung dieser Zahlen kann man die Geschwindigkeit des Abfalls und die Überlebenszeit der transfundierten Erythrozyten ersehen.

b) Bestimmung mit Hilfe von radioaktivem Chrom⁵¹:

Prinzip:

Durch die Markierung der roten Blutkörperchen mit radioaktiven Isotopen kann man den Abbau der Eigen-

Erythrozyten im Organismus des Erkrankten verfolgen. Seit 1950 wird Chrom⁵¹ zur Bestimmung der Erythrozyten-Lebensdauer verwendet, da es die Erythrozyten-Membran relativ leicht durchdringt und mit dem Globin-Anteil eine stabile Bindung eingeht (G r a y und S t e r = l i n g; E b a u g h, E m e r s o n und R o s s). Nach dem Erythrozyten-Abbau ist es infolge eines Valenzwechsels nicht mehr in der Lage, Erythrozyten erneut zu markieren, sondern wird mit dem Urin ausgeschieden. Das Prinzip der Erythrozyten-Lebensdauerbestimmung mit Chrom⁵¹ besteht darin, daß man Eigen-Erythrozyten in vitro mit $\text{Na}_2\text{Cr}^{51}\text{O}_4$ markiert und diese dann dem Patienten re-injiziert. Anschließend entnimmt man über einen Zeitraum von Tagen oder Wochen Blutproben von diesem Empfänger und bestimmt die darin enthaltene Radioaktivität. Mit wachsenden zeitlichen Abständen vom Injektionstermin tritt eine von verschiedenen Faktoren abhängige progrediente Verminderung der Radioaktivität ein. Aus der Geschwindigkeit des Aktivitätsabfalles sind Rückschlüsse auf die Erythrozyten-Lebensdauer möglich.

Ausführung:

Wir lehnten uns dabei eng an die von M o l l i = s o n und V e a l l angegebene Modifikation der ursprünglichen Technik an. Da uns hochempfindliche Messgeräte zur Verfügung standen, konnten wir die Aktivitätsmenge an Chrom⁵¹ auf die relativ niedrige Dosis von 50 μCurie reduzieren. Dies bedeutet in unseren Augen einen wesent=

lichen Fortschritt, da dadurch die Strahlenbelastung sehr niedrig und ausreichende Sicherheit für den Patienten und die Umgebung gewährleistet ist. Bei dieser geringen Dosis sind Schädigungen nicht mehr zu erwarten, da 600 μ Curie bereits als unschädlich angesehen werden und als einmalige Dosis erlaubt sind.

Zur Markierung der Erythrozyten werden einem Patienten etwa 20 ccm Blut entnommen, wobei die Gerinnung durch ein Anticoagulanz verhindert wird. Diesem Blut werden 50 μ Curie Chrom⁵¹ in Form einer sterilen Lösung von $\text{Na}_2\text{Cr}^{51}\text{O}_4$ hinzugefügt. Anschließend bleibt die mit Cr^{51} inkubierte Erythrozyten-Suspension für etwa 60 Minuten bei Zimmertemperatur stehen. Dann sind bereits mehr als 90 % des radio-aktiven Chroms an die Erythrozyten gebunden. Nach den Angaben von Schmidt, Schmitt, Keiderling, Matthes und Feiser wird nach der Inkubation - um mechanische Traumen zu vermeiden - keine Waschung der Erythrozyten durchgeführt. Sie wird durch Vitamin C-Zugabe (3 mg/ml Blut) ersetzt. Die Ascorbinsäure reduziert das 6-wertige Chrom zu 3-wertigem, das die Erythrozyten-Membran nicht durchdringen und daher von den roten Blutkörperchen nicht aufgenommen werden kann. Es wird nach teilweiser Bindung an Plasma-Eiweißkörper sehr schnell im Urin ausgeschieden. Danach wird das Blut dem Spender re-injiziert.

Die in der ersten, etwa 30 Minuten nach der Injektion abgenommenen Blutprobe enthaltene Aktivität, die nach Hämolysieren mit Hilfe eines Scintillationszählers gemessen wird, gilt als Bezugswert (100 %-Wert) für alle übrigen Blutproben, die in bestimmten zeitlichen Abständen - etwa zweimal wöchentlich oder bei stärkerer Hämolyse noch häufiger - so lange abgenommen werden, bis die Aktivität auf 50 % des Ausgangswertes (sogenannte "scheinbar halbe Erythrozytenlebensdauer") abgesunken ist. Die gefundene Radioaktivität dieser Blut=

proben wird als Prozent des Ausgangswertes angegeben.

Unter Berücksichtigung der Halbwertszeit des Chrom⁵¹ ist eine rechnerische Korrektur für den Aktivitätswert jeder Blutprobe erforderlich, worauf jedoch verzichtet werden kann, wenn nach Abschluß der Lebensdauerbestimmung die Aktivität aller Blutproben eines Falles zum gleichen Zeitpunkt gemessen wird.

2. Kreuztest zum Nachweis und Charakterisierung der gesteigerten, nicht-immunologischen Hämolyse:

Um die beim lebenden Patienten, d. h. in vivo festgestellte Hämolyse - Tendenz auch in vitro darzustellen, haben wir einen einfachen Kreuztest entwickelt, der uns im Vergleich zu den Markierungstechniken außerdem noch in die Lage versetzt, die Faktoren, die zur verstärkten Lyse führen, näher zu differenzieren (F r i t z s c h e, G r a b i s c h und F i s c h e r).

Prinzip:

Das Prinzip unserer Untersuchungsmethode ist sehr einfach: Mehrfach gewaschene frische Erythrozyten eines Patienten und eines gesunden, blutgruppengleichen Spenders werden im Eigenserum und im Serum des Spenders bzw. des Patienten unter sterilen Bedingungen bei 37° C inkubiert. Nach etwa 20 Stunden tritt in nahezu allen Fällen Hämolyse von unterschiedlicher Stärke auf. Der Hämolysegrad wird photometrisch bestimmt und in Beziehung gesetzt zu den Hämolysewerten in den Vergleichs-

röhrchen desselben Ansatzes. Als Maß der normalen Hä-
molyse besitzen wir den Ansatz mit den Gesunden-Ery-
throzyten im Gesunden-Serum.

Ausführung:

Das gleichzeitig einem Patienten und einem ge-
sunden Spender aus der Cubitalvene entnommene Vollblut
wird 60 Min. bei Zimmertemperatur stehen gelassen, um
den Endpunkt der Gerinnung abzuwarten. Es ist sehr wich-
tig, daß alle Blutproben zum gleichen Zeitpunkt entnom-
men und in genau gleicher Weise verarbeitet werden. An-
schließend wird zentrifugiert und das Serum entnommen.
Aus dem Blutkuchen werden mit isotonischer NaCl-Lösung
vorsichtig Erythrozyten herausgewaschen, durch sterilen
Mull kolliert und 2 - 3 mal auf der Zentrifuge gewaschen.

Vom Endsediment werden je eine 0,5 %ige Suspen-
sion in physiologischer NaCl-Lösung hergestellt. Jeweils
1,0 ml dieser Suspensionen werden für die verschiedenen
Ansätze in sterile Wa-Röhrchen pipettiert, nach Zentri-
fugieren die überstehende Lösung mit ausgezogener Saug-
pipette quantitativ entnommen und das Sediment entweder
in 1,0 ml Eigenserum oder im Serum des Spenders bzw.
des Patienten resuspendiert. Anschließend wird im Was-
serbad bei 37° C ca. 20 Stunden inkubiert. Während die-
ser Zeit werden die Zellen 2 - 3 mal von Hand aufge-
schüttelt. Der Hämolysegrad im abzentrifugierten Serum
wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 546 mμ
bestimmt (Photometer "Eppendorf"; Kleinküvette 1,0 ml
Schichtdicke). Als Leerwert dient jeweils das native
Serum.

Stark lipämische Seren verfälschen ebenso wie
solche mit hohem Blutzuckergehalt die Ergebnisse. Große
Leukozytenbeimengungen, die die Hämolyse verhindern,
müssen vermieden werden.

Eine Voraussetzung für die exakte Durchführung

des Kreuztestes ist, daß steril gearbeitet wird und daß nur solche Röhrchen und Pipetten verwendet werden, die absolut frei von Netzmitteln sind.

3. Bestimmung von Enzym-Aktivitäten der Erythrozyten:

Wir untersuchten die Aktivität zweier Enzyme, die für die Erhaltung des roten Blutfarbstoffes in funktionsfähigem Zustand von grundsätzlicher Bedeutung sind: der Katalase und der Hämoglobin-Reduktasen.

a) Katalase:

Prinzip:

Wasserstoffsuperoxyd (H_2O_2) absorbiert ultraviolette Licht. Bei seiner Zerstörung durch die in den Erythrozyten vorhandene Katalase zu Wasser und Sauerstoff vermindert sich diese Absorption. Im Absorptionsmaximum für H_2O_2 (im uv.-Licht bei einer Wellenlänge von 240 $m\mu$) wird die Geschwindigkeit der Abnahme der Absorption und des Anstieges der Lichtdurchlässigkeit über eine gewisse Zeit verfolgt und zur Aktivität des Enzymes in Beziehung gesetzt.

Ausführung: (B e t k e und G r ö s c h n e r)

Aus frischem, durch Zugabe von einigen Tropfen Heparin (Liquemin "Roche") ungerinnbar gemachten Blut wird nach mehrmaligem Waschen der roten Blutkörperchen

auf der Zentrifuge eine 0,5 %ige Erythrozyten-Suspension in isotonischer NaCl-Lösung hergestellt. Diese Erythrozyten werden dann durch einige Tropfen einer frisch zubereiteten 1 %igen Digitonin-Lösung hämolytisiert. Wegen des unterschiedlichen Hb-Gehaltes des gesunden Probanden und des anämischen Patienten ist es notwendig, das Hämolysat auf die gleiche Hb-Konzentration einzustellen (ca. 100 mg%. $E = 0,8$ im Photometer "Eppendorf" $\lambda = 546 \text{ m}\mu$).

Zur Herstellung der geeigneten H_2O_2 -Lösung verwenden wir die 30 %ige Perhydrol-Lösung "Merck" in paraffinierter Flasche, verdünnen 1 : 1 000 auf eine Endkonzentration von 0,03 %. Als Verdünnungslösung nehmen wir den Phosphat-Puffer nach Sörensen (1/10 molar, pH 7,0), der vorher aber 1 : 2 mit aqua dest. verdünnt wird, so daß eine Endkonzentration von 1/20 molar herrscht.

Bestimmung im Spektrophotometer "Beckman":

Die Quarzküvette füllt man mit 2,5 ml der 0,03 %igen H_2O_2 -Lösung und mißt die Extinktion gegen Wasser bei einer Wellenlänge von 240 $\text{m}\mu$. Im Strahlengang des Photometers werden mit einer schlank ausgezogenen Blutzucker-Pipette 0,03 ml des Hämolysates eingeblasen und gut durchmischt. Gleichzeitig mit dem Einblasen wird eine Stoppuhr in Gang gesetzt. Im 30 Sekunden-Abstand mißt man nun die Abnahme der Absorption über etwa 4 Minuten.

In der Auswertung trägt man die Logarithmen der absinkenden Extinktionen gegen die Zeit auf. Dabei muß eine Gerade entstehen, da die Katalase-Reaktion nach dem Muster einer Reaktion erster Ordnung verläuft. Der Nullwert, den man durch graphische Extrapolation erhält, liegt über dem zuvor gemessenen Wert der H_2O_2 -Lösung, weil der Blutfarbstoff selbst noch eine Extinktionsänderung verursacht. Aus der Neigung der Geraden

kann man die Reaktionsgeschwindigkeit ablesen.

b) Hämoglobin-Reduktasen:

Prinzip:

Erythrozyten werden durch Natrium-Nitrit quantitativ in Hb^{III}-enthaltende Zellen überführt. Nach Auswaschen des überstehenden Natrium-Nitrits werden diese "braunen Zellen" resuspendiert und bei 37° C inkubiert. In bestimmten Zeitabständen - meist 1 - 3 Stunden - wird die spontane Reduktion des Hb^{III} in Hb^{II} verfolgt.

Ausführung:

Die Erythrozyten aus frischem Venenblut, das durch Zusatz von Heparin ungerinnbar gemacht worden war, werden vom Plasma getrennt und dreimal auf der Zentrifuge mit 0,9 %iger Kochsalz-Lösung gewaschen. Der rote Blutfarbstoff wird anschließend zu Methämoglobin oxydiert, indem man die gewaschenen Erythrozyten mit Ringer-Phosphat-Lösung, die 1/5 Volumen frisch angesetztes 1,17 %iges Natrium-Nitrit enthält, 10 Min. lang im Wasserbad bei 37° C inkubiert. Danach werden die nun tief braun gefärbten Zellen zweimal mit Ringer-Phosphat-Lösung gewaschen, um das überstehende Natrium-Nitrit zu entfernen. Nun werden die "braunen Zellen" so in Ringer-Phosphat-Lösung aufgeschwemmt, daß in jedem Röhrchen die gleiche Menge Blutfarbstoff vorhanden ist. (Zyanhämoglobin-Methode nach B e t k e und S a v e l s b e r g.)

Vor der Inkubation im Wasserbad bei 37° C zur Bestimmung des 100 %-Wertes an Hb^{III} sowie nach gewis-

sen Zeitabständen - meist 90 und 180 Minuten - werden Proben aus jedem Ansatz-Röhrchen entnommen und die darin enthaltenen Erythrozyten durch aqua dest. hämolyseiert. Der vorhandene Hämiglobin-Anteil wird nach der Zyanid-Methode von H a v e m a n n, J u n g und v. I s s e k u t z bestimmt, indem man im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 630 ~~mu~~ die Extinktion vor und nach Zugabe eines Tropfen einer 10 %igen KCN-Lösung mißt. Die Differenz der Extinktionen ist ein Maß für das vorhandene Hb^{III} . Auf diese Weise ist es möglich, die Reduktion von Hb^{III} in Hb^{II} zu verfolgen.

E r g e b n i s s e.

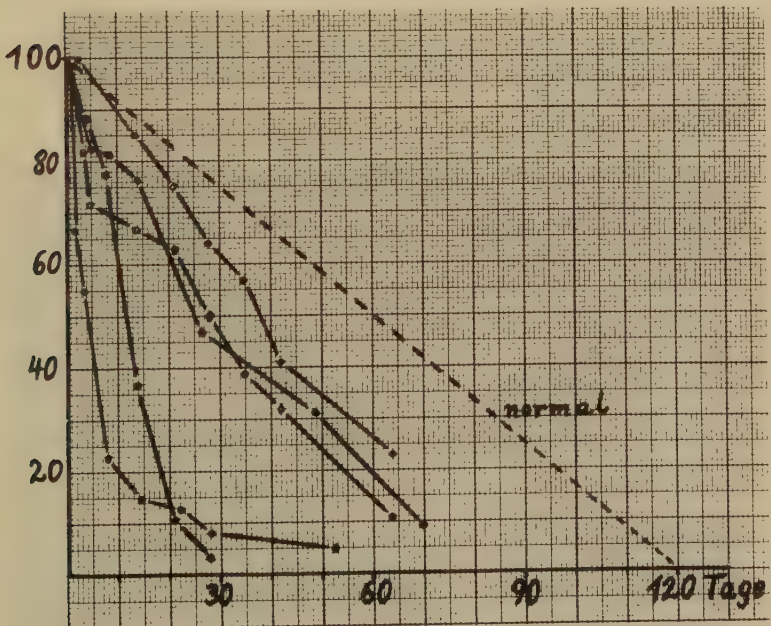
1. Nachweis der gesteigerten Hämolyse:

Nach Beschreibung der angewandten Versuchsmethoden sollen nun die Ergebnisse geschildert werden. Wie schon erwähnt, wurde erst in jüngerer Zeit durch markierte rote Blutkörperchen festgestellt, daß sogar auch dann ein verstärkter Abbau der Erythrozyten vorhanden sein kann, wenn die gewöhnlichen klinischen Zeichen einer gesteigerten Hämolyse fehlen. Der gesteigerte Abbau tritt klar hervor, wenn die Erythrozyten-Lebensdauer verkürzt ist.

Aus diesem Grunde bestimmten wir bei mehreren Patienten, die bei einer der angeführten Grundkrankheiten eine Anämie entwickelt hatten, die Lebensdauer markierter Erythrozyten.

Eine graphische Darstellung der Ergebnisse unserer Untersuchungen geben die ersten beiden Abbildungen wieder. Die Abb. 1 zeigt einige typische Kurven, die wir bei Bestimmung der Lebensdauer transfundierter Erythrozyten mit Hilfe der Differential-Agglutination fanden. Auf der Ordinate ist die Anzahl der übertragenen Erythrozyten angegeben, ausgedrückt in Prozent-Zahlen der Menge sofort nach der Transfusion, auf der Abscisse der zeitliche Abstand der einzelnen Bestimmungen von der erfolgten Transfusion in Tagen.

Abb. 1: Verweildauer transfundierter Erythrozyten im zirkulierenden Blut von Patienten mit Leukämien und Urämie.



Nach den übereinstimmenden Angaben der meisten Autoren beträgt die normale Lebensdauer der roten Blutkörperchen etwa 120 Tage (A s h b y, D a c i e und M o l l i s o n, B e r l i n, S c h l e g e l und B ö t t n e r).

Bei den leukotischen und urämischen Patienten fanden wir deutliche Verkürzungen der Erythrozyten-Überlebenszeit, was im steileren Verlauf der Kurven sichtbar wird.

Einige mit der Chrom⁵¹-Methode bei Normalpersonen (gestrichelte Kurven) und bei Patienten mit hämolytischen Anämien (linke Kurvenschar) gewonnenen Ergebnisse sind in

Abb. 2: Kurvenverlauf bei Bestimmungen der Erythrozyten-Lebensdauer mit Hilfe der Radiochrom-Markierung.

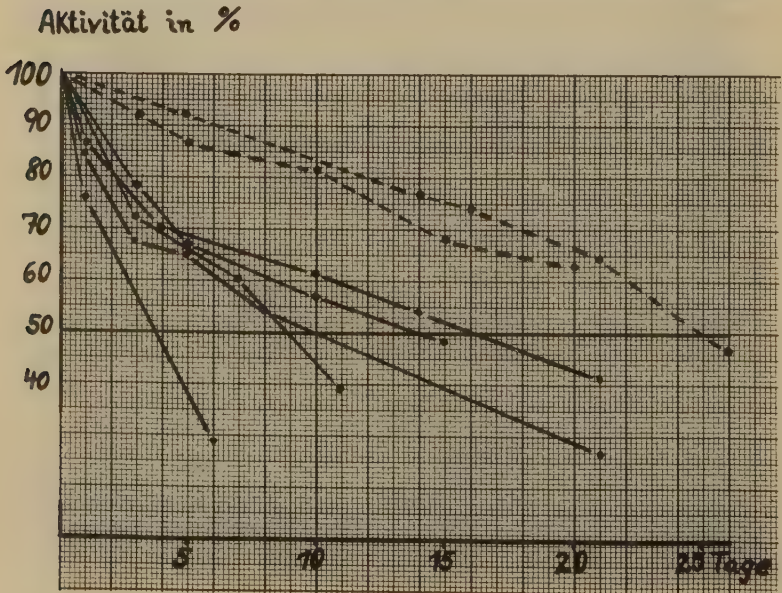


Abb. 2 wiedergegeben.

Beim Gesunden wird der 50 %-Wert der Ausgangs-Aktivität zwischen dem 24. - 32. Tag erreicht (sogenannte "scheinbar halbe Erythrozyten-Lebensdauer" nach N e c h e l e s, W e i n s t e i n und L e R o y). Wird nun dieser 50 %-Wert früher erreicht, dann liegt eine gesteigerte Hämolyse mit Verkürzung der Erythrozyten-Lebensdauer vor.

Auch mit dieser Methode stellten wir bei den untersuchten Patienten eine gesteigerte Hämolyse mit deutlicher Verkürzung der Erythrozyten-Lebensdauer fest.

2. Kreuztest:

Den Kreuztest haben wir fast ausschließlich mit dem Blut von solchen Patienten angestellt, die eine erhebliche Anämie des eingangs geschilderten Typus hatten, bei denen der Nachweis von Antikörpern negativ war und bei denen schließlich die verkürzte Lebensdauer der roten Blutkörperchen entweder mit der Differential-Agglutinationsmethode nach A s h b y oder mit Cr^{51} -markierten Erythrozyten gesichert war.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen zeigen, daß zwei grundsätzlich verschiedene Typen von verstärkter Hämolyse voneinander unterschieden werden können.

Bei der Mehrzahl der untersuchten Patienten findet sich ein Hämolysetyp, als dessen charakteristisches Beispiel die Ergebnisse eines Kreuztestes bei einem Patienten mit Lymphogranulomatose stehen sollen.

Abb. 3:

Kreuztest bei pathol. Serum - Lysin (H. Hodgkin Pat. Ia)		% Hämolyse nach 20 ^h , 37°
Erythrocyten Pat.	→ Serum Pat.	73
	→ Serum Ges.	48
Erythrocyten Ges.	→ Serum Pat.	84
	→ Serum Ges.	48

Hier findet sich die stärkste Lyse immer bei der Kombination: gesunde Erythrozyten im Serum vom Patienten, aber auch die Kombination: Patienten-Erythrozyten in Patienten-Serum zeigte regelmäßig eine gegenüber dem normalen Kontrollsystem verstärkte Lyse. Diese Befunde sprechen dafür, daß wir es mit lyseverstärkenden Serum-Faktoren zu tun haben. Diese Faktoren sind nur zum Teil thermolabil; denn auch hitze-inaktiviertes Patienten-Serum besitzt meist noch - obgleich in abgeschwächtem Maße - lysierende Kraft.

Bei einigen Patienten ist die lysierende Aktivität gegenüber normalen Erythrozyten im Kreuztest größer als gegenüber den eigenen Erythrozyten. Wahrscheinlich kommt dieses Phänomen aber einfach dadurch zustande, daß der überwiegende Teil der Gesunden-Erythrozyten älter ist als die des Patienten. So ist zum Beispiel die Überlebenszeit der Erythrozyten beim Patienten Ia. auf

weniger als die Hälfte herabgesetzt. Die alten Erythrozyten fallen schneller der Lyse anheim als die jungen. Die Erythrozyten solcher Patienten verhalten sich im Kreuztest im Patienten-Serum wie auch im Gesunden-Serum fast wie normale Erythrozyten. Wie noch später ausgeführt werden soll, ist auch die Aktivität der Erythrozyten-Katalase dieser Patienten nicht erniedrigt.

Bei der zweiten Gruppe - meist Patienten mit fortgeschrittener Niereninsuffizienz - zeigte sich, daß die stärkste Lyse in den Röhrchen zu beobachten war, in welchen Erythrozyten des Patienten im Serum der gesunden Kontrollperson inkubiert waren. Diese Tatsache spricht eindeutig dafür, daß die Erythrozyten von Patienten mit Urämie geschädigt sind, die Hämolyse also auf einem korpuskulären Defekt beruht.

Abb. 4:

Kreuztest bei typ. Erythroc.-Schädigung (Urämie)		% Hämolyse nach 20 ⁿ , 37°
Erythrocyten Pat.	→ Serum Pat.	37
	→ Serum Ges.	88
Erythrocyten Ges.	→ Serum Pat.	25
	→ Serum Ges.	54

In der nun folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der von uns bisher mit dem oben beschriebenen Kreuztest untersuchten 58 Patienten mit sekundärer, nicht-immunologischer hämolytischer Anämie zusammengefaßt:

Tab. 1:

Im Kreuztest untersuchte Fälle

Diagnose	Anzahl	Vermehrte Lyse	Serum-Faktor	Erythrozyten-Faktor
Myeloische Leukose	18	16	14	2
Lymphatische Leukose	13	7	6	1
Tumoranämie	8	5	5	—
Urämie	14	10	1	9
Lymphogranulomatose	4	3	3	—
Panmyelophthise	1	1	1	—

Dabei konnten wir feststellen, daß in 42 Fällen eine verstärkte Hämolyse eintrat. Bei zahlreichen Patienten wiederholten wir im Verlauf ihrer Erkrankung unsere Untersuchungen, wobei wir immer zu gleichsinnigen Ergebnissen gelangten.

Zur Verlässlichkeit des Kreuztestes und Reproduzierbarkeit seiner Ergebnisse ist folgendes zu sagen:

So einfach wie das Prinzip ist, so sind doch eine Reihe von Voraussetzungen zu erfüllen, um reproduzierbare Werte zu erhalten. Hierzu gehören:

1. Ausschließliche Untersuchung des Blutes nüchterner Probanden, da stark lipämische Seren und hoher Blutzuckergehalt die Ergebnisse beeinflussen;
2. Gleichzeitige Abnahme und Aufarbeitung der Blutproben vom Kranken und der gesunden Vergleichsperson;
3. Steriles Arbeiten; peinlich saubere - ohne Netzmittel gespülte - Röhrchen und Pipetten.

Als Beispiel für die Reproduzierbarkeit des Kreuztestes sollen in der folgenden Abbildung die Ergebnisse einer wiederholten Untersuchung bei demselben Patienten an verschiedenen Tagen angegeben werden:

Abb. 5:

		% Hämolyse nach 20 Std.	
		7. 8.	8. 8.
Ery.-Pat.	Serum Pat.	17	17
	Serum Ges.	80	69
Ery.-Ges.	Serum Pat.	13	12
	Serum Ges.	66	65

3. Enzym-Studien an Erythrozyten:

Mit Hilfe des Kreuztestes ist es auf verhältnismäßig einfache Weise möglich, - unter Umgehung der aufwendigen Erythrozyten-Lebensdauer-Bestimmungen - die gesteigerte Hämolyse nachzuweisen.

Meine Aufgabe sollte es nun sein, einen Beitrag zur Pathogenese der gesteigerten Hämolyse zu liefern.

Ich entschied mich, diejenigen Fälle eingehender zu untersuchen, bei denen die gesteigerte Lyse im Kreuztest auf einem korpuskulären Defekt beruhte. Es ging also

darum, eine nachgewiesene Schädigung der Erythrozyten genauer zu analysieren.

Angeregt durch die mikroskopische Beobachtung, daß die Erythrozyten der Patienten mit Urämie als sichtbaren Ausdruck ihrer Schädigung häufig H e i n z ' s c h e Innenkörperchen aufweisen, die auf einen erhöhten Gehalt an Methämoglobin mit dreiwertigem Eisen schließen lassen, bestimmte ich zunächst die Aktivitäten der Katalase und des Hämoglobin-Reduktasen-Systems in diesen Erythrozyten.

Der Katalase kommt nach den Untersuchungen von B i n g o l d ein geradezu spezifischer Schutz des Blutfarbstoffes gegenüber peroxydatisch wirksamen Kräften zu. Sie verhindert die Oxydation des Fe^{II} zu Fe^{III} . Die Reduktasen überführen das normalerweise geringgradig vorhandene dreiwertige Fe des Hämoglobin, das für die reversible Sauerstoff-Bindung ausfällt, in Fe^{II} . Diese beiden Enzyme sind also für die Erhaltung des Erythrozyten in funktionsfähigem Zustand besonders wichtig.

Die Bestimmungen wurden sowohl bei künstlich geschädigten Erythrozyten wie auch mit den roten Blutkörperchen von Patienten mit Niereninsuffizienz durchgeführt.

Dabei stellte ich in zahlreichen Bestimmungen fest, daß in der Tat die Katalase-Aktivität der Erythrozyten bei diesen Patienten im Durchschnitt um 26,7 % herabgesetzt ist.

Tab. 2:

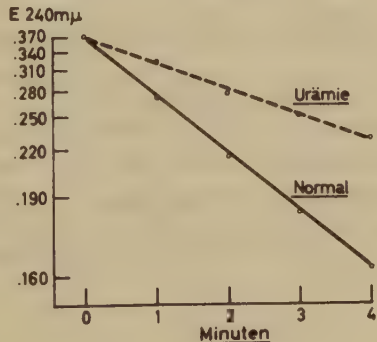
Extinktionsdifferenz beim			Katalase-Aktivität des
Ges.	Pat.		Pat. im Vergleich zum
			gesunden Probanden
1.	220	165	Herabgesetzt um 25 %
2.	240	200	" " 17 %
3.	165	50	" " 70 %
4.	195	128	" " 35 %
5.	193	134	" " 31 %
6.	216	163	" " 25 %
7.	190	130	" " 32 %
8.	190	160	" " 16 %
9.	215	160	" " 26 %
10.	215	170	" " 21 %
11.	215	190	" " 12 %
12.	245	220	" " 11 %
13.	245	185	" " 25 %
14.	245	200	" " 19 %

Nebenstehende Abbildung möge durch einen charakteristischen Befund diese Ergebnisse verdeutlichen. Man sieht das Verhalten der Katalase beim Gesunden und Kranken. Auf der Ordinate ist logarithmisch die Abnahme der Extinktion aufgetragen, auf der Abszisse die Zeit.

Abb. 6:

Katalase

Zersetzung von H_2O_2 (E240m μ) durch Ery von Gesunden und von Patienten mit Urämie



Die Aktivität der Erythrozyten-Katalase derjenigen Patienten, bei denen die verstärkte Hämolyse im Kreuztest durch ein pathologisches Serum-Lysin bedingt war, fanden wir in unseren Untersuchungen überhaupt nicht erniedrigt, ja, gelegentlich war sie sogar gegenüber der gesunder Vergleichspersonen gering erhöht (s. Tab.).

Tab. 3:

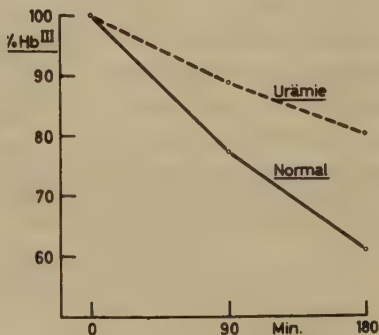
Diagnose	Extinkt.-Differenz		Katalase-Aktivität im Vergleich zur Kontrollperson
	Ges.	Pat.	
1. Tumoranämie	220	220	$\pm$ 0 %
2. Akute Leukämie	215	240	+ 11 %
3. Chron. Myelose	193	195	+ 1 %
4. Chron. Myelose	193	198	+ 3 %
5. M. Hodgkin	193	195	+ 1 %
6. M. Hodgkin	165	185	+ 13 %
7. Chron. Myelose	190	200	+ 5 %
8. Chron. Myelose	220	208	- 6 %

Abb. 7:

Reduktase

Rückreduktion von Ferr-Hb in Ery
von Gesunden und von Patienten mit Urämie

Bei den Erythrozyten von urämischen Patienten zeigte sich ebenfalls eine deutliche Verminderung der Reduktion von Häminglobin.



Modellversuche zur Erythrozyten-Schädigung

Welche Stoffe die Erythrozyten-Schädigung bei Urämikern verursachen, ist unklar. Nach B e c h e r sollen vor allem phenolartige Substanzen für die "renale Anämie" verantwortlich sein.

F i s c h e r und Mitarbeiter haben vor einigen Jahren auf die zellschädigende Wirkung von Eiweißabbauprodukten - insbesondere stark basischer Polypeptide - hingewiesen. Sie konnten - wie schon oben erwähnt wurde - zeigen, daß normale Erythrozyten nach Vorbehandlung mit Polysaccharidkomplexen, Eiweißspaltprodukten und Zellkernsubstanzen im R-Glas vorzeitig und verstärkt aufgelöst werden. Dies war der Anlaß, das Verhalten von Katalase und Reduktase bei in vitro vorgeschädigten Erythrozyten zu untersuchen.

Ich ging dabei so vor: Erythrozyten gesunder Versuchspersonen werden ungefähr 60 Minuten lang mit neutralen Lösungen von Protamin (0,05 %ig), Thymus-Histon (0,1 %ig) und Fibrinolyse-Spaltprodukten im Wasserbad bei 37° C inkubiert. Für Reduktase-Untersuchungen ist eine längere Vorinkubation von mehreren Stunden Dauer notwendig. Danach werden die Erythrozyten zweimal auf der Zentrifuge gewaschen und in isotonischer NaCl-Lösung suspendiert. Anschließend wird nach den beschriebenen Methoden die Aktivität der Katalase und Hämoglobin-Reduktasen bestimmt.

Das Ergebnis derartiger Versuche ist in den Abbildungen 8 und 9 graphisch dargestellt.

Abb. 8:

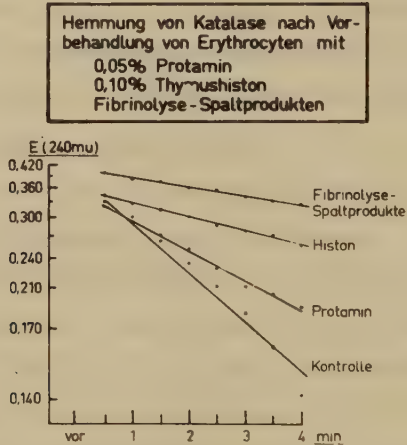
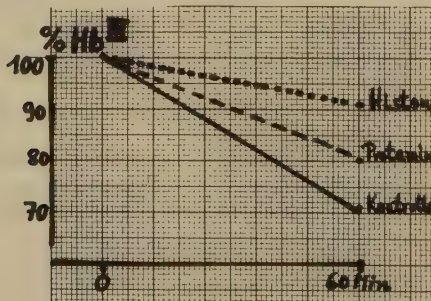


Abb. 9: Hemmung der Reduktasen:



Wie zu ersehen ist, hemmen Protamin und Histon die Katalase wie auch die Reduktasen im Vergleich zu den Kontrollen ganz deutlich.

Dieser Modellversuch zeigt somit eine Möglichkeit auf, wie eine Erythrozyten-Schädigung mit Hemmung der Katalase- und Reduktase-Aktivität zustande kommen kann.

4. Versuche zur Beeinflussung der gesteigerten Cytolyse:

a) Verzögerung der Lyse von in vitro vorgeschädigten Erythrozyten durch Purin-Nucleoside:

In vitro kann man Erythrozyten jedoch nicht nur schädigen, sondern es ist auch möglich, vorgeschädigte Zellen so zu behandeln, daß Zellfunktion und Überlebenszeit gebessert werden. F i s c h e r und F r i t z = s c h e haben darauf aufmerksam gemacht, daß die gesteigerte Hämolyse unterdrückt oder vermindert werden kann, wenn man den im Serum inkubierten, vorbehandelten Erythrozyten Purin-Nucleoside zusetzt.

Diesen Befund konnte ich in zahlreichen Untersuchungen bestätigen, indem ich im Kreuztest den Einfluß von Adenosin und Inosin in ansteigenden Konzentrationen auf die Überlebenszeit von Erythrozyten beobachtete, die durch halbstündige Inkubation mit 0,1 %-iger Protamin-Lösung vorgeschädigt worden waren.

Abb. 10:

Verzögerung der unspez. Lyse durch Adenosin u. Inosin		
Erythrocyt. vorgeschädigt mit 0,1% Protamin; 30'; 37°	% Hämolyse	
	nach 6 ^h	nach 26 ^h
aktiv - Serum	41	90
56° - -	15	78
aktiv - - + 1 mM	39	86
- - - + 3 "	28	67
- - - + 5 "	24	42

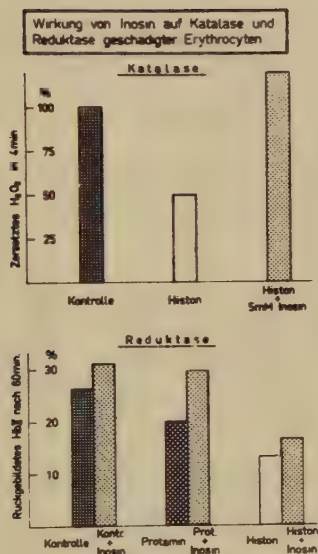
Aus der Abbildung kann man ersehen, daß die fast vollständige Hämolyse der geschädigten Erythrozyten nach einer Inkubationsdauer von 26 Stunden im aktiven Serum durch Zusatz von 5 mM Adenosin oder Inosin auf 42 % vermindert werden kann.

b) Beeinflussung der Enzym-Aktivitäten:

Für meine Fragestellung war es nun besonders interessant zu untersuchen, ob sich nicht auch die Enzym-Systeme Katalase und Hämiglobin-Reduktase vorgeschädigter Erythrozyten unter Inosin-Gaben erholen können.

Ich ging dabei so vor, daß die zunächst mit Histon bzw. Protamin vorgeschädigten Erythrozyten gewaschen wurden und dann nochmals mit 5 mMolarer Inosin-Lösung für 60 Minuten bei 37° C inkubiert wurden. Danach wurden die Enzym-Aktivitäten gemessen.

Abb. 11:



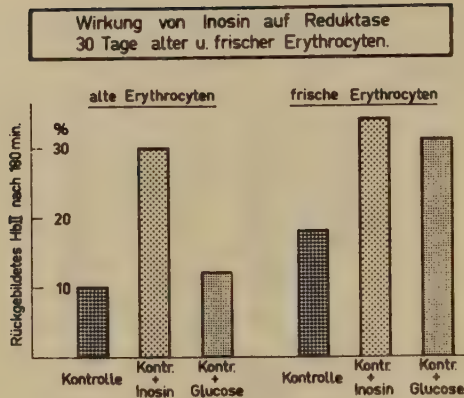
Die Abbildung zeigt, daß die Katalase bei den in vitro geschädigten Erythrozyten fast wieder die ursprüngliche Aktivität erreicht.

Ähnliches gilt auch für die Reduktase.

Glukose als Substrat ist nur bis zu einem gewissen Grade imstande, die für die Zellfunktion notwendige Energie zu produzieren. Wir fanden einen unterschiedlichen Effekt von Inosin und Glukose auf die Reduktase-Aktivität gealterter Erythrozyten.

Auf der rechten Hälfte von Abb. 12 sieht man, daß die Wirkung von Inosin und Glukose auf frische Erythrozyten, d. h. auf frisch aus der Vene entnommene

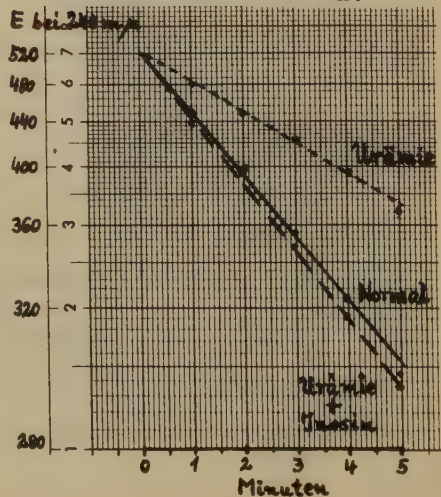
Abb. 12:



etwa gleich ist. Im Gegensatz dazu ist bei Erythrozyten aus einer 30 Tage alten Blutkonserve nur noch Inosin wirksam, während die Glukose nicht mehr utilized werden kann.

Anschließend an diese Untersuchungen ging ich der Frage nach, welchen Einfluß das Inosin auf die gehemmte Katalase der Erythrozyten urämischer Patienten ausübt. Dabei konnte ich feststellen, daß die ursprünglich verminderte Katalase-Aktivität des Urämikers nach einem Zu-

Abb. 13: Wirkung von Inosin auf Katalase urämischer Patienten.



setz von 5 mmol Inosin vollständig der normalen Enzym-Aktivität einer gesunden Kontrollperson angeglichen wird.

c) Verzögerung der gesteigerten Hämolyse von in vivo vorgeschädigten Erythrozyten durch Inosin:

Auf Grund dieser Ergebnisse untersuchten wir im Kreuztest die Wirkung des Inosins auf das Blut von urämischen Patienten, bei denen, wie oben ausgeführt wurde, die gesteigerte Hämolyse auf einen Erythrozyten-Schaden zurückzuführen ist. In jedes Ansatz-Röhrchen kamen 5 mmol Inosin. Auch hier konnten wir, wie aus der nachfolgenden Abbildung klar ersichtlich ist, eine deutliche Verzögerung der gesteigerten Hämolyse nachweisen.

Abb. 14: Verzögerung der Hämolyse im Kreuztest durch Inosin bei Patienten mit Urämie.

		% Hämolyse nach 20 Std.	
			+ 5 mmol Inosin
Ery.-Pat.	Serum Pat.	38	24
	Serum Ges.	100	28
Ery.-Ges.	Serum Pat.	28	10
	Serum Ges.	64	25

D i s k u s s i o n d e r E r g e b n i s s e .

Anämien von wechselnder Stärke können eine hervorstechende Nebenerscheinung der Leukämien, Lymphogranulomatose, malignen Tumoren, intensiver Bestrahlung, Rheumatismus, Tuberkulose und der terminalen Stadien der chronischen Niereninsuffizienz sein. Nach einer neueren klinisch-statistischen Übersicht über 903 Leukosen von G r o s s , W i l d h a c k und S t e i n e r findet man bei 91 % der akuten Leukosen, 84 % der chronischen Myelosen und 56 % der chronischen Lymphadenosen bei der Klinikaufnahme eine Anämie, d. h. Hb unter 80 % von meist normochromen Charakter. Unter den 200 von R e i m e r und S t a t t m a n n beobachteten Fällen mit chronischer Nephritis wiesen 50 % eine Anämie mit weniger als 3 000 000 Erythrozyten auf.

Sieht man das recht umfangreiche Schrifttum über die Anämien, die im Gefolge der erwähnten Krankheitsbilder auftreten, einmal daraufhin durch, was über die Pathogenese bekannt ist, so stellt man fest, daß eine ganze Reihe von Faktoren beteiligt sind. In erster Linie wird eine verminderte Erythropoese infolge von Verdrängung des Knochenmarkes durch leukämische Infiltrationen diskutiert, dann eine toxische Schädigung der Blutneubildung. In einzelnen Fällen kann die Anämie durch einen Mangel an Folsäure oder Vitamin B₁₂ bedingt sein. Auch ein Eisenmangel kommt als Ursache in Frage, der durch

Blutverluste oder durch Abwanderung des Eisens in das RES hervorgerufen wird.

Die mögliche Bedeutung der gesteigerten Hämolyse für die Entstehung dieser sekundären Anämieformen ist erstmalig 1906 erwähnt. H i r s c h f e l d hat als erster die Pathogenese und den Mechanismus der Anämie bei Leukämien (der "Leukanämien") eingehender und kritischer studiert. Er diskutiert den Einfluß eines meist latent verstärkten Erythrozyten-Abbaus vom Gesichtspunkt der An- oder Abwesenheit von Hämosiderin in der Leber. Im allgemeinen war kein Anstieg des Hämosiderin-Gehaltes gefunden worden, was als Argument gegen die Möglichkeit einer gesteigerten Hämolyse verwendet worden war. Ein Fall von Leukämie mit schwerer Anämie und beträchtlicher Vermehrung des Hämosiderins in der Leber veranlaßte ihn zu glauben, daß in diesem besonderen Falle ein hämolytischer Faktor vorhanden gewesen sein könne.

P a p p e n h e i m berichtet neben der einfachen mechanischen Verdrängung des erythropoetischen Gewebes von der Möglichkeit eines hämolytisch wirksamen Giftes, das vom leukämischen Gewebe produziert werde.

Daß klinische und hämatologische Zeichen einer Hämolyse sehr selten beobachtet werden, stellte P a s c h k i s fest. Er vermutete ebenso wie v. K r e s s trotzdem, daß die leukämischen Zustände begleitende Anämie ihre Entstehung nicht einer

mechanischen Erdrückung des erythropoetischen Gewebes verdankt, sondern daß hämolytische Vorgänge einen wichtigen Faktor in der Pathogenese der Anämie darstellen. Der vermehrte Erythrozyten-Abbau konnte aber nie direkt bewiesen werden.

Auch für die Pathogenese der Anämie bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz werden die genannten Faktoren verantwortlich gemacht, daneben eine Depression des Knochenmarkes sowie eine Schädigung der zirkulierenden Erythrozyten durch die retinierten harnpflichtigen Stoffe.

B e c h e r wies als erster auf die Zusammenhänge von Anämie und Nierenkrankheit hin. Er schuldigte bei der Genese der "renalen Anämie" aromatische Darmfäulnisprodukte (Phenole, Indol, Kresol, aromatische Oxysäuren) an, die die Blutbildung hemmen sollten, da Zeichen eines verstärkten Blutzerfalles nicht festzustellen seien. Anämien bei chronischer Vergiftung mit Phenol sowie mit verwandten Körpern seien durchaus geläufig. Diese Substanzen würden im Organismus durch Oxidation retinierter Darmgifte entstehen. Tierexperimentelle Untersuchungen von T ö n n i s und B r u s i s, die bei Hunden Darmblindsäcke anlegten und mit dem Ansteigen der Darmfäulnisprodukte eine Anämie sich entwickeln sahen, die nach Entfernung der Blindsäcke wieder verschwand, waren geeignet, diese Ansicht zu stützen.

Auch bei der nephrogenen Anämie war eine gesteigerte Hämolyse öfter vermutet worden, konnte aber nie bewiesen werden.

Erst in den letzten Jahren, seitdem es möglich geworden ist, auch routinemäßig direkte Bestimmungen der Lebensdauer roter Blutkörperchen durchzuführen, hat man erkannt, daß eine verkürzte Lebenszeit der markierten Erythrozyten - mit anderen Worten - eine vorzeitige und gesteigerte Mauserung bei all den oben genannten sekundären Anämieformen gefunden werden kann.

R. B e r l i n machte zuerst auf Grund seiner Untersuchungen mit der Differential-Agglutinationsmethode auf hämolytische Veränderungen bei Leukämien aufmerksam. Er stellte fest, daß es in der Mehrzahl der Fälle von chronischer Leukämie ein hämolytisches Syndrom gibt in dem Sinne, daß es nur indirekt demonstriert werden kann und daß klinisch manifeste Zeichen eines vermehrten Blutabbaus in Form von Ikterus, Hämoglobinämie, Urobilinogenurie, stark erhöhte Retikulozytenwerte u. s. w. fehlen. Er bezog die vermehrte Hämolyse auf eine Hypersplenie und diskutierte den Einfluß der Splenektomie auf die Anämie. Bei einer Myelose wiesen die Erythrozyten nach der Splenektomie eine normale Lebensdauer auf und die Anämie ging zurück.

B r o w n, E l l i o t und Y o u n g fanden unter Benutzung der gleichen Methode in 3 von 4 Fällen mit lymphatischer Leukämie einen gesteigerten Untergang der roten Blutkörperchen.

Auch S c h l e g e l und B ö t t n e r stellten mit der A s h b y - Technik Beziehungen zwischen der verkürzten Lebensdauer der Erythrozyten und dem

Grade der Anämie bei Leukämien fest. Gemeinsam mit B o c k konnten sie als erste den gleichen Mechanismus der nephrogenen Anämie beweisen. Sie fanden bei 14 Patienten mit Urämie, daß ein niedriger Hb-Gehalt von einer verkürzten Lebensdauer der Erythrozyten begleitet war. Sie konnten aber keine Beziehungen zwischen der Überlebenszeit der Erythrozyten auf der einen Seite und der Nierenfunktion, dem Blutdruck und der Dauer der Krankheit auf der anderen Seite nachweisen.

E m e r s o n und B u r r o w s berichten von 4 Patienten mit einer stärkeren Anämie und Azotämie, bei denen die Überlebenszeit der Erythrozyten auf ein Drittel des Normalen verkürzt war. Diese Autoren betonten jedoch, daß in diesen Fällen die Anämie hauptsächlich einer Herabsetzung der Erythropoese zuzuschreiben sei. Sie geben aber auch zu, daß wegen der ungewöhnlichen Schnelligkeit, mit der die Spender-Erythrozyten nach der Transfusion abgebaut wurden, ein zusätzlicher hämolytischer Faktor wahrscheinlich beteiligt sei.

In der Folgezeit wurde von einer großen Anzahl von Untersuchern (B r ü s c h k e und H e n n e m a n n , S c h m i d t und K e i d e r l i n g , P r i b i l l a , G e h r m a n n , S c h e i t l i n und F r i c k , M o l l i s o n , W e t h e r l e y - M e i n und Mitarbeiter, L a s c h , M e n t h e und S c h n e i d e r u. a.) mit der Radiochrom-Methode die Lebensdauer der roten Blutkörperchen bei den genannten Erkrankungen bestimmt und die gleichen Beobachtungen gemacht, daß die Lebensdauer der Erythrozyten auf $\frac{2}{3}$ bis $\frac{1}{4}$ des Normalen herabgesetzt ist.

Die neueste Übersicht über die Pathogenese der erworbenen, nicht-immunologischen, hämolytischen Anämien stammt von W a s s e r m a n n und Mitarbeitern.

Nach diesen Bestimmungen müßte man erwarten, auch klinisch häufiger Hinweise auf hämolytische Vorgänge zu beobachten. Die Erfahrung lehrt jedoch, daß dies tatsächlich nicht der Fall ist. Schon all den genannten Autoren fiel auf, daß der gesteigerte Erythrozyten-Abbau klinisch sich nicht in den klassischen Hämolyse-Zeichen:

- 1) Ikterus mit überwiegend "indirekter" v. d. Bergh'scher Reaktion,
- 2) vermehrter Urobilinogenurie,
- 3) Retikulozytose

ausdrückte, weshalb B e r l i n in solchen Fällen von einem "latenten hämolytischen Syndrom" sprach.

Nun muß allerdings betont werden, daß z. B. ein nur geringer Anteil hämolytischer Vorgänge an einer ausgeprägten, durch ein anderes Grundleiden bedingten Anämie sich klinisch häufig dem Nachweis entzieht. Von H e n n e m a n n sowie von B o c k und Mitarbeitern ist erst in letzter Zeit auf die Schwierigkeiten bei der Erkennung einer Hämolyse bei den Leukosen hingewiesen worden. Die bei anderen Hämolysen außerordentlich empfindliche und zuverlässige Reaktion der Retikulozyten darf man nicht zur "conditio sine qua non" machen, da die leukämisch eingeschränkte Erythropoese nicht oder nur beschränkt reaktionsfähig ist. Das Serumbilirubin kann

bei protrahiertem Zerfall der Erythrozyten nicht oder nur gering vermehrt sein.

Das Fehlen der Hämolyse-Zeichen brauchte jedoch nicht zu beunruhigen, solange man unter "latenter Hämolyse" nur eine relativ geringe Steigerung des physiologischen Erythrozyten-Abbaus verstand (ohne hämolytische Krisen und ohne exzessive Vermehrung der Retikulozyten).

Die Beobachtung, die von A r g e n t o n an der I. Medizinischen Universitäts-Klinik in Frankfurt/M. seit Jahren immer wieder erhoben wurde, war dagegen geeignet, die "latente" Hämolyse in einem ganz anderem Lichte erscheinen zu lassen. Er beobachtete, daß bei der meist im Spätstadium von Leukämien, Lymphogranulomatose und ähnlichen Systemerkrankungen langsam zunehmenden Anämie auch gehäufte und in kurzen Abständen wiederholte Bluttransfusionen praktisch ohne jede Wirkung auf Erythrozyten-Zahl und Hb-Gehalt bleiben. Die zugeführten Erythrozyten werden in kurzer Zeit aufgelöst. Auch wenn man große Blutmengen in kurzer Zeit überträgt, so kommt es trotz des außerordentlichen Blutumsatzes nicht zum hämolytischen Ikterus. Das zugeführte Blut verschwindet bei diesen anikterischen hämolytischen Anämien wie in einem Faß ohne Boden, weshalb H o f f dieses auffallende Phänomen als "Danaiden-Phänomen" bezeichnete.

Diese Beobachtung bildete den Ausgangspunkt für

die vorliegenden Untersuchungen. Zunächst habe ich mich davon überzeugt, daß tatsächlich die Lebensdauer der Erythrozyten in den Fällen von erworbener, nicht serologisch bedingter Anämie bei den genannten Grundkrankheiten verkürzt ist, wie aus den beiden Kurven zu ersehen ist. Damit ist die gesteigerte Hämolyse trotz Fehlen erhöhter Retikulozytenwerte und kaum vermehrter Urobilinogen-Ausscheidung im Harn bewiesen.

Über die von mir zu Anfang verwendete Differential-Agglutination nach A s h b y herrschen Meinungsverschiedenheiten über die Genauigkeit der Methode. Ihr hauptsächlichster Nachteil ist die Unmöglichkeit, die eigenen Erythrozyten im eigenen Organismus zu verfolgen. Sie erfordert außerdem ein verhältnismäßig mühsames Verfahren, bei dem die Patienten über Wochen und Monate sorgfältig kontrolliert werden müssen. Titterschwankungen der erforderlichen starken Antiseren können zur Fehlerquelle werden.

Die auch in einzelnen Fällen angewandte Radiochrom-Markierung ist zwar sehr viel einfacher und sicherer, aber wegen der möglichen Strahlengefährdung - vor allem junger Patienten - nicht ganz unbedenklich.

Diese Methode hat aber außerdem eine sehr wichtige therapeutische Konsequenz. Sie erleichtert nämlich die Indikationsstellung zur Splenektomie. Im Gegensatz zur kongenitalen Sphärozytose ist die Splenektomie bei der erworbenen hämolytischen Anämie nur in ungefähr der Hälfte der Fälle erfolgreich. Durch perkutane Messung

der Chromaktivität über Herz, Leber und Milz läßt sich der hauptsächlichste Abbauort der markierten Erythrozyten feststellen und der Wert der Splenektomie vor dem Eingriff abschätzen (P r i b i l l a , E r n s t und R ö t t g e n , S c h m i d t und K e i d e r = l i n g , W e i n r e i c h).

Es erschien deshalb wünschenswert, einen einfachen und ungefährlichen Test zum Nachweis und eventuell auch näheren Charakterisierung der gesteigerten Hämolyse zu haben; denn diese beiden recht aufwendigen Methoden stehen schon aus technischen Gründen nur einer sehr begrenzten Anzahl von Untersuchern zur Verfügung.

Mit dem Kreuztest, den ich an einem größeren Krankengut erproben konnte, ist es möglich, die gesteigerte Hämolyse auch ohne großen Aufwand an Zeit und komplizierten Apparaten nachzuweisen. Der beschriebene Kreuztest hat nach unserer Meinung im Vergleich zu den Markierungstechniken den weiteren Vorteil, daß er die Faktoren, die zu einer verstärkten Hämolyse führen, näher zu analysieren gestattet. Er ermöglicht nämlich mit einiger Sicherheit die Unterscheidung, ob die zur gesteigerten Hämolyse führende Noxe auf einer korpuskulären Schädigung oder auf dem Vorhandensein lysefördernder Serumfaktoren beruht. Besitzt nämlich das Patienten-Serum eine stärkere lysierende Aktivität, so wird in diesen Röhrchen unabhängig von den suspendierten Erythrozyten eine stärkere Hämolyse eintreten. Sind die Patienten-Erythrozyten geschädigt, so werden diese

stärker gelöst, ganz gleich, in welchem Serum sie suspendiert sind.

Von C r o s b y und B e n j a m i n wurde 1957 eine der unserigen sehr ähnliche Kreuzprobe zum Nachweis der gesteigerten Hämolyse bei nicht serologisch bedingten, sekundären Anämien angegeben. Für ihren Test verwenden sie sowohl Heparinplasma als auch Serum. Ebenso wie wir ziehen sie zur Kreuzkontrolle Serum und gewaschene Erythrozyten gesunder gruppengleicher Spender heran. Während der 24-stündigen Inkubation bei 37° C überschichten sie ihre Ansätze mit Paraffin und messen schließlich den Grad der Hämolyse im Überstand quantitativ mit der Benzidin-Reaktion.

Wie zu erwarten, stimmen die Ergebnisse der mit Patientenblut vorgenommenen Kreuzproben mit den unserigen weitgehend überein. Bei Leukämikern und Patienten mit Lymphogranulomatose finden C r o s b y und B e n j a m i n einen hämolysierenden Serumfaktor und daneben gelegentlich auch eine Erythrozyten-Schädigung, die sich durch eine leicht verstärkte Lyse im Normalserum bemerkbar macht.

Zu einem etwas anderen Ergebnis als wir kommen allerdings C r o s b y und B e n j a m i n , wenn sie beschreiben, daß die Hitze-Inaktivierung von Serum praktisch keinen Einfluß auf die Hämolyse ausübt und das lysierende Prinzip infolgedessen unabhängig vom Properdin-System sei.

In unseren Versuchen haben wir festgestellt, daß immer ein erheblicher Unterschied zwischen dem Grad der Lyse im aktiven und im inaktivierten Serum vorhanden ist, auch wenn bei Patienten mit lytischen Serumfaktoren letztere häufig zum Teil thermostabil sind.

Welche Substanzen im einzelnen für die gesteigerte Hämolyse verantwortlich sind, ist noch unbekannt. Auf Grund der Tatsache, daß dieser Hämolyse-typ vorwiegend im Finalstadium von Leukämien, Lymphogranulomatose und disseminierten neoplastischen Erkrankungen auftritt, ist anzunehmen, daß Substanzen, die aus dem in solchen Krankheitsstadien immer vorhandenen massiven Zellzerfall frei werden, für die vermehrte Lyse verantwortlich sind. In diesem Sinne sprechen auch Modellversuche, in denen eine Verstärkung der unspezifischen Lyse nach Vorbehandlung der Erythrozyten mit Eiweißspaltprodukten und Polysaccharid-Komplexen gefunden wurde (Fischer und Fritzsche).

Wir glauben, daß der beschriebene Kreuztest für die Klärung dieser noch ungelösten Fragen, vor allem aber für die rasche und in jedem Kliniklaboratorium durchführbare Erkennung von Krankheitszuständen mit hämolytischer Komponente von Nutzen sein kann.

Wie durch den Kreuztest nachgewiesen werden konnte, ist bei den Patienten mit chronischer Nieren-

insuffizienz die gesteigerte Hämolyse auf einen Erythrozyten-Schaden zurückzuführen. In diesem Sinne spricht auch das Ergebnis eines Versuches von S c h l e g e l und B ö t t n e r , die sich im Selbstversuch Blut eines Patienten mit chronischer Glomerulonephritis, nephrogener Anämie und urämischen Erscheinungen transfundierten und im gesunden Organismus mit Hilfe der Differential-Agglutination eine Lebensdauer der Patienten-Erythrozyten von 25 Tagen gegenüber normal 120 Tagen feststellten. Dies zeigt deutlich, daß die Erythrozyten urämischer Patienten in irgendeiner Form in ihrer Vitalität geschädigt sind.

In weiteren Untersuchungen sollte nun die nachgewiesene Schädigung näher analysiert werden.

Wodurch kommt die verkürzte Überlebenszeit dieser Erythrozyten zustande? Man hat angenommen, daß die normale Lebensdauer der Erythrozyten durch einen mechanischen Verschleißvorgang begrenzt sei. Gerade beim "blassen" Hochdruck des Nierenkranken sollten die Erythrozyten mit erhöhtem Druck durch die enggestellten Gefäße gepreßt und so geschädigt werden. Die Erythrozyten-Membran sollte den Belastungen im Blutkreislauf auf die Dauer nicht gewachsen sein. Daß der Erythrozyt im Laufe einer allmählichen Alterung Zellveränderungen erfährt, zeigt die Abnahme der osmotischen Resistenz mit der Alterung (S c h l e g e l , B ö t t n e r und D u n k e).

Fundierter ist die Ansicht, daß die entscheidenden Alterungsvorgänge sich im Zellinneren abspielen. Der Zelltod ist danach in erster Linie eine Abnutzungsfolge der zahlreichen Enzym-Substrat-Systeme, die für die Funktion der Erythrozyten lebensnotwendig sind.

In den letzten Jahren haben die Enzymopathien der Erythrozyten großes Interesse gefunden. Erst vor kurzem ist das Krankheitsbild der "enzymopenischen hämolytischen Anämie" herausgearbeitet worden. L ö h r und W a l l e r , deren Arbeiten wesentlich zur Kenntnis dieser Störung beigetragen haben, konnten nachweisen, daß viele der durch verschiedene Medikamente (Chinolin- und Anilin-Derivate, Phenacetin, Sulfonamide u. a. sowie bestimmte Leguminosen wie Favabohnen und Erbsen) ausgelösten hämolytischen Anämien, die häufig als allergisch angesehen wurden, in Wirklichkeit Folge eines erblichen Enzymdefektes der Erythrozyten sind. Den mit diesem Defekt behafteten Menschen fehlt das am Anfang des Hexose-Monophosphat-Zyklus stehende Enzym Glukose-6-phosphat-dehydrogenase oder es ist stark erniedrigt. Beim Kontakt mit den genannten Stoffen reagieren sie unter Umständen mit einer starken Hämolyse.

Von besonderer Bedeutung für die volle Vitalität des Erythrozyten sind Ferment-Systeme, die den Blutfarbstoff in der zur reversiblen Sauerstoff-Bindung fähigen Form erhalten (Hämoglobin-Reduktasen) sowie die dazu

notwendige Energie liefern. P o n d e r diskutiert als Ausdruck des Enzym- und Materialverschleisses bei fortschreitender Zellalterung eine Abnahme der Katalase und eine Zunahme von Choleglobin im Erythrozyten. Auch nach den Untersuchungen von S c h l e g e l und K a p p e s t nimmt mit zunehmendem Lebensalter der Gehalt der Erythrozyten an Katalase wie auch an verschiedenen Enzymen der Glykolyse deutlich ab. Von den zahlreichen Enzymen der Glykolyse weisen bei der natürlichen Erythrozyten-Alterung in vivo nur die Glukose-6-phosphat-dehydrogenase und die Phosphoglycerinaldehyddehydrogenase einen starken exponentiellen Abfall ihrer Aktivitäten auf, wie L ö h r und W a l l e r in sorgfältigen Untersuchungen zeigen konnten. Das Enzym Phosphoglycerinaldehyddehydrogenase wird zum limitierenden Faktor und macht nach etwa 50 Tagen die Verwertung der Glukose unmöglich. Durch den Ausfall dieser Enzyme werden die energieliefernden Reaktionen der Glykolyse unterbrochen.

H e u b n e r sowie B r e n n e r und A l l i s o n stellen die Bedeutung einer Aktivitäts-Minderung der Katalase für die H e i n z - Körper-Bildung im Erythrozyten besonders heraus. K ü n z e r und Mitarbeiter teilen mit, daß im Neugeborenenblut relativ häufig H e i n z - Körper vorhanden sind und daß sie im Erythrozyten aus Nabelschnurblut experimentell leichter produziert werden können als im Ery-

throzyten Erwachsener. Im Nabelschnurblut ist die Katalase in ihrer Aktivität gegenüber Erwachsenenblut um 40 % vermindert. B e t k e und Mitarbeiter fanden bei Neugeborenen eine signifikant geringere Reduktionsfähigkeit als bei einem Kollektiv von Kindern und Erwachsenen.

Ausgehend von unserer mikroskopischen Beobachtung, daß in den Erythrozyten urämischer Patienten, bei denen wir nach Markierung eine verkürzte Erythrozyten-Lebensdauer und im Kreuztest eine gesteigerte Hämolyse durch einen korpuskulären Defekt nachweisen konnten, häufig H e i n z'sche Innenkörperchen vorhanden waren, untersuchte ich die Aktivität der Katalase und der Hämoglobin-Reduktasen dieser Erythrozyten. Dabei stellte ich fest, daß die Aktivität der Katalase um durchschnittlich 26,7 % im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen herabgesetzt war. Auch die Aktivität der Hämoglobin-Reduktasen war signifikant vermindert.

Meine Feststellung, daß die Erythrozyten-Katalase der leukämischen Patienten, bei denen im Kreuztest die gesteigerte Hämolyse durch Serum-Faktoren bedingt war, normal oder sogar erhöht ist, steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von K l a u s , H e n n e m a n n und B e t h m a n n .

Vor allem der Modellversuch von F i s c h e r und-Mitarbeitern, daß die zellauflösende Wirkung aktiven Serums durch Vorbehandlung normaler Erythrozyten mit verschiedenen Substanzen verstärkt werden kann, so daß die

Überlebenszeit der Erythrozyten verkürzt ist, ließ mich die Aktivitäten der genannten Enzyme geschädigter Erythrozyten untersuchen. Dabei wurde gefunden, daß Histon, Protamin und Fibrinolyse-Spaltprodukte einen deutlichen Einfluß im Sinne einer Hemmung der Enzym-Aktivitäten ausüben.

Besonders dieser Modellversuch ist geeignet zu zeigen, wie eine Schädigung der Erythrozyten zustande kommen kann. Auf eine ähnliche Weise können beim urämischen Patienten die retinierten harnpflichtigen Substanzen eine Hemmung der Katalase und der empfindlichen Enzyme der energieliefernden Reaktionen verursachen und eine vorzeitige Alterung der Erythrozyten herbeiführen, die verstärkt der Lyse anheimfallen.

Gibt es nun irgendwelche Möglichkeiten, diese Schädigung zu verhindern oder einen eventuell schon eingetretenen Erythrozyten-Schaden wieder auszugleichen? Ein Weg, den vorzeitig einsetzenden Zelltod hinauszuzögern, besteht darin, den Energiestoffwechsel der Erythrozyten so zu verbessern, daß Zellfunktion und Lebensdauer verlängert werden. Vom Gesichtspunkt der Haltbarmachung der Blutkonserve ist dieses Problem intensiv bearbeitet worden. Denn außerhalb des Organismus verlieren die Erythrozyten rasch ihre Lebensfähigkeit. Entscheidend für die Blutkonservierung ist aber die Überlebensquote der transfundierten Erythrozyten im Organismus des Empfängers. Die morphologische

und funktionelle Intaktheit der Zellen ist untrennbar mit dem Zellstoffwechsel verknüpft. Es ist bekannt, daß in den konservierten Erythrozyten im Laufe der Alterung die Konzentration an Kalium und organischen Phosphat - Verbindungen abnimmt und die Konzentration anorganischer Phosphate in dem Maße zunimmt wie die Zellen fortschreitend ihre Lebensfähigkeit verlieren (F i n c h und G a b r i o). Der Verlust der Vitalität wird durch die Abnahme der Energiequellen der Zelle verursacht, besonders durch den Verlust des energiereichen ATP. Als Energiequelle stehen dem Erythrozyten nämlich nur die Bindungsenergien aus energiereichen Phosphaten zur Verfügung, da bei ihm die Enzyme der Atmungskette und des Zitronensäure - Zyklus nicht vorhanden sind.

Eine bessere Überlebensrate nach der Reinfusion konnte bei den in saurer Zitrat-Lösung mit Glukose-Zusatz (ACD-Lösung) konservierten Erythrozyten dadurch erreicht werden, wenn man, wie G a b r i o und F i n c h sowie P r a n k e r d und A l t m a n unabhängig voneinander gefunden haben, der Konservierungsflüssigkeit Adenosin zugesetzt hatte. Die Lebensdauer der Erythrozyten konnte durch Lagerung in Gegenwart von Purin-Nucleosiden wesentlich verlängert werden.

Durch Verlust von energiereichen Phosphaten (vor allem ATP und 2,3-Diphosphoglycerinsäure) bei der Lagerung wird der Ablauf der Glykolyse gehemmt, weil Glukose infolge von ATP-Mangel nicht mehr phosphoryliert

werden kann. Die Nucleoside können mit ihrem Ribose-Anteil in den anaeroben Teil des Pentosephosphat-Zyklus eingehen, wobei die Nucleosid-Bindungen ohne wesentlichen Energieverlust in energiereiche Phosphat-Bindungen umgewandelt werden. P r a n k e r d und A l t m a n , H o c k und H u b e r sowie F i s c h e r und Mitarbeiter zeigten, daß P^{32} -markiertes Phosphat in Gegenwart von Adenosin oder Inosin im wesentlichen in ATP und 2,3-Diphosphoglycerinsäure eingebaut wird.

Die Mechanismen, durch welche die Nucleoside die Erythrozyten "verjüngen", scheinen in ihrer Fähigkeit zu liegen, die Synthese von ATP und dadurch anderer organischer Phosphate der Erythrozyten anzuregen. Für die Wirkung der Purin-Nucleoside ist der Ribose-Anteil verantwortlich zu machen.

Von verschiedenen Autoren (z. B. G a b r i o und Mitarbeiter, P r a n k e r d) wurde folgender Mechanismus für das Eingreifen der Purin-Riboside in den Kohlehydrat-Stoffwechsel der Erythrozyten diskutiert: Adenosin, Inosin und Guanosin durchdringen die Zellmembran und werden innerhalb der Zelle durch eine Nucleosid-Phosphorylase in Anwesenheit von anorganischem Phosphat in Purin und Ribose-1-phosphat aufgespalten. Letzteres kann über Ribose-5-phosphat in den anaeroben Teil des Pentose-Phosphat-Zyklus eingreifen, wobei das Triose-Phosphat Glycerinaldehyd-phosphat gebildet wird, aus dem auf bekannte Weise über 1,3-Diphosphoglycerat ATP und

tuierende Wirkung. Ebenso werden die genannten Enzyme von in vivo geschädigten Erythrozyten, nämlich bei solchen von urämischen Patienten durch Inosin in ihrer Aktivität der einer gesunden Kontrollperson angeglichen. Besonders eindrucksvoll ist die Feststellung, daß auch diese Erythrozyten, die im Kreuztest verstärkt aufgelöst werden, durch Zugabe von Inosin eine eindeutige Verzögerung der Cytolyse zeigen.

Bisher sind in meinen Untersuchungen nur in vitro-Versuche zur Beeinflussung der gesteigerten Hämolyse beschrieben worden. Gegen eine therapeutische Anwendung des Inosins bei den anämischen Patienten mit Niereninsuffizienz, deren Erythrozyten im R-Glas ganz deutlich stabilisiert werden, muß angeführt werden, daß das Hypoxanthin des Inosins oder allgemein gesprochen der Purinanteil des Nucleosids zu Harnsäure abgebaut wird und bei den Niereninsuffizienten zu einer weiteren Steigerung des Rest-N führen muß. Müller fand tatsächlich, daß es bei Kranken mit Niereninsuffizienz und erhöhten Rest-N-Werten bei langsamer Infusion von Inosin-Mengen bis 5 g zu länger dauernder Erhöhung der Harnsäurewerte im Serum kam.

Z u s a m m e n f a s s u n g .

Es wird auf eine Reihe erworbener, nicht-immunologischer Sekundäranämien hingewiesen, deren hämolytische Komponente wegen des Fehlens klinisch manifester Hämolysezeichen häufig verkannt wird.

Durch Bestimmung der Erythrozyten-Lebensdauer mit Hilfe der Differential-Agglutination oder mit der Radio-Chrom-Methode kann gezeigt werden, daß bei vielen Erkrankungen des blutbildenden Systems, bei malignen Tumoren sowie bei chronischer Niereninsuffizienz ein gesteigerter Abbau roter Blutkörperchen vorliegt, auch wenn die gewöhnlichen klinischen Zeichen keinen Anhalt dafür bieten.

Zum Studium der Lyse von Erythrozyten im homologen Serum wird ein Test beschrieben, mit dem es gelingt, die Hämolyse-Tendenz auch in vitro darzustellen. Bei gekreuzter Anordnung kann unterschieden werden, ob vermehrt Serumlysine vorhanden sind oder ob ein korpuskulärer Defekt vorliegt.

Bei den anämischen Patienten mit Niereninsuffizienz wird häufig ein Erythrozyten-Schaden vorgefunden, während Patienten mit Leukämie, bösartigen Tumoren und Lymphogranulomatose überwiegend vermehrte Serumlysine aufweisen.

Bei Untersuchungen des Zellstoffwechsels der geschädigten Erythrozyten wird eine Minderung von Enzym-Aktivitäten - der Katalase und der Hämoglobin-Reduktasen - gefunden.

Es wird gezeigt, daß die gesteigerte Cytolyse - auch die vorgeschädigter Erythrozyten - in vitro durch Purinnucleoside gehemmt werden kann und die verminderten Enzym-Aktivitäten auf Normalwerte gebessert werden.

Die Bedeutung der Purinriboside bei der Blut-Konservierung und ihr Einfluß auf den Erythrozyten-Stoffwechsel werden diskutiert.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s .

1) ARGENTON, H.:

in: "Hämolyse und hämolytische Erkrankungen".
7. Freiburger Symposium. Vortrag: FISCHER, H.,
H. ARGENTON und W. FRITZSCHE: Nichtimmunologi-
sche hämolytische Serumfaktoren in der mensch-
lichen Pathologie. Springer-Verlag 1961 S. 65

2) ASHBY, W.:

The determination of the length of life of the
transfused blood corpuscles in man.
J. Exper. Med. 29, 267 (1919)

3) ASHBY, W.:

The span of life of the red blood cells.
A resumé. Blood 3, 486 (1948)

4) BECHER, E.:

Vorkommen und Ursachen der Anämie bei Nieren-
krankheiten. Münch. med. Wschr. 39, 1657)

5) BERLIN, R.:

Red Cell Survival Studies in Normal and Leu-
kaemic Subjects. Acta Med. Scand. Stockholm
Suppl. 252, Vol. 139 (1951)

6) BETKE, K. und E. GRÖSCHNER:

Das Verhalten der Katalase in den Erythrozyten
hypochrom-anämischer Säuglinge und Kleinkinder.
Klin. Wschr. 37, 535 (1959)

7) BETKE, K., E. KLEIHAEUER, D. OSTER und I. SCHLICHT:

Methämoglobinreduktion als Stoffwechselleistung
roter Zellen bei normalen und anämischen Säug-
lingen und Kleinkindern.
Ztschr. f. Kinderheilk. Bd. 80, 54 (1957)

8) BETKE, K. und W. SAVELSBERG:

Stufenphotometrische Hämoglobinbestimmung
mittels Cyanhäoglobin.
Biochem. Z. 320, 431 (1950)

9) BINGOLD, K.:

Über die Bedeutung der Katalase in biologischer
und klinischer Beziehung.
Dtsch. med. Wschr. 80, 603 (1955)

10) BINGOLD, K.:

Über Wesen und Funktion der Katalase.
Ärztl. Forsch. 1, 41 (1947)

11) BOCK, H. E., H. BÖTTNER und B. SCHLEGEL:

Die Lebensdauer übertragener Erythrozyten bei
Nierenkranken. Ein Beitrag zur Pathogenese der
nephrogenen Anämie. Ztschr. ges. exper. Med.
118, 459 (1952)

12) BOCK, H. E., R. GROSS, K. LAMBERS und G. WULF:

Leukämie und Leber. Die Medizinische J. 1959,
S. 1325

13) BÖTTNER, H. und B. SCHLEGEL:

Lebensdauer übertragener, gesunder Erythrozyten
bei bösartigen Erkrankungen des blutbildenden
Systems. Klin. Wschr. 30, 498 (1952)

14) BÖTTNER, H. und B. SCHLEGEL:

Erythrocytenzerstörende Vorgänge bei Tuberku-
losekranken. Tuberkulosearzt 7, 525 (1953)

15) BRENNER, S. and A. C. ALLISON:

Catalase Inhibition: A possible mechanism for
the production of Heinz bodies in erythrocytes.
Experientia 9, 381 (1953)

16) BROWN, G. M., S. M. ELLIOT, and W. A. YOUNG:

The Haemolytic Factor in the Anaemia of
Lymphatic Leukaemia. J. clin. Invest. 30, 130 (1951)

17) BRÜSCHKE, G. und H. H. HENNEMANN:

Die Bestimmung der Erythrocytenlebensdauer bei
Leukosen mit Radiochrom, nebst methodischen
Studien zur Chrommarkierung der Erythrocyten.
Dtsch. Arch. klin. Med. 205, 263 (1958)

- 18) CROSBY, W. H. and N. R. BENJAMIN:

An Abnormal Hemolytic System Associated with Leukemia and Other Disseminated Malignant Diseases. Blood 12, 701 (1957)

- 19) DACIE, J. V. and P. L. MOLLISON:

The survival of normal erythrocytes after transfusion to patients with familiar haemolytic anaemia. Lancet 1, 550 (1943)

- 20) DENSTEDT, O. F.:

in: DeGowin, Hardin and Alsever: "Blood Transfusion". W. B. Saunders Company, Philadelphia & London (1949) S. 203

- 21) DEUTSCH, E., M. FISCHER und H. FRISCHAUF:

Anämien bei Nierenkrankheiten. Wien. Ztschr. Inn. Med. u. Grenzgebiete 42, 286 (1961)

- 22) EBAUGH, F. G., CH. P. EMERSON and J. F. ROSS:

The use of radioactive Chromium⁵¹ as an erythrocyte tagging agent for the determination of red cell survival in vivo. J. clin. Invest. 32, 1260 (1953)

- 23) EMERSON, CH. P. and B. A. BURROWS:

The mechanism of anemia and its influence on renal function in chronic uremia. J. clin. Invest. 28, 779 (1949)

- 24) EPPINGER, H., H. KAUNITZ und H. POPPER:

Die seröse Entzündung, eine Permeabilitäts-Pathologie. Wien, Springer-Verlag (1935)

- 25) FINCH, C. A. and B. W. GABRIO:

Prolongation of viability of the stored erythrocyte. J. clin. Invest. 33, 932 (1954)

- 26) FISCHER, H., W. FRITZSCHE und H. ARGENTON:

Die Bedeutung des Properdinsystems für den normalen und gesteigerten Blutzellabbau. Klin. Wschr. 36, 411 (1958)

- 27) FISCHER, H. und W. FRITZSCHE:

Properdinsystem und unspezifische Lyse von Körperzellen. IV. internat. Kongr. Biochemie, Wien (1958)

- 28) FISCHER, H., E. FERBER, W. FRITZSCHE, F. WOSEGIEN
und W. SPIELMANN:
Erythrocytenstoffwechsel und Blutkonservierung. Bibl. haemat., Vol. 12, 76 (1961)
- 29) FRITZSCHE, W., F. GRABISCH und H. FISCHER:
Ein einfacher Kreuztest zum Nachweis und zur Charakterisierung der gesteigerten nicht-immunologischen Hämolyse. Folia haemat. N. F. 4, 256 (1960)
- 30) GEHRMANN, G.:
Untersuchungen mit radioaktivem Chrom bei hämolytischen Anämien. Dtsch. med. Wschr. 85, 1097 (1960)
- 31) GABRIO, B. W., C. A. FINCH and F. M. HUENNEKENS:
Erythrocyte preservation: a topic in molecular biochemistry. Blood XI, 103 (1956)
- 32) GIANNOPOULOS, P. and D. E. BERGSAGEL:
The mechanism of the anemia associated with Hodgkin's disease. Blood 14, 856 (1959)
- 33) GORMSEN, J. and P. A. GJØRUP:
Anemia in chronic diseases of the kidneys. Dan. med. Bull. 2, 195 (1955)
- 34) GRAY, S. J. and K. STERLING:
The tagging of red cells and plasma proteins with radio-active chromium.
J. clin. Invest. 29, 1604 (1950)
- 35) GROSS, R., R. WILDHACK und H. STEINER:
Klinisch-statistische Übersicht über 900 Leukosen. Dtsch. med. Wschr. 83, 1974 (1958)
- 36) HAVEMANN, R., F. JUNG und B. v. ISSEKUTZ:
zit. nach: HINSBERG/LANG: "Medizinische Chemie". Urban & Schwarzenberg 3. Aufl. S. 1048 (1957)
- 37) HENNEMANN, G.:
Beobachtung über das gleichzeitige Auftreten von Lymphogranulomatose und hämolytischer Anämie. Die Medizinische J. 1953 S. 914

38) HENNEMANN, H. H.:

Leukämiestudien IV. Hämolytische Syndrome bei Leukämien, zugleich ein Beitrag zur Fehldiagnose: hämolytische Anämie mit leukämoider Reaktion oder myeloische Leukose. Ztsch. ges. inn. Med. u. Grenzgeb. 11, 436 (1956)

39) HEUBNER, W.:

Methämoglobin, Innenkörper der Erythrozyten und Anämie. Klin. Wschr. 20, 137 (1941)

40) HIRSCHFELD, H.:

Über Leukanämie. Pol. haemat. 3, 332 (1906)

41) HOCK, A. und G. HUBER:

Einfluß von Inosin auf den Einbau von P^{32} -Orthophosphat in die Phosphorverbindungen von Erythrozyten bei der Lagerung. Hoppe-Seyler's Ztsch. phys. Chem. 308, 116 (1957)

42) HOFF, F.:

zit. nach 26)

43) HYMAN, G. A.:

The anemia of cancer. Amer. J. Roentgenol. 79, 511 (1958)

44) JENSEN, K. B.:

Anaemia in Hodgkins Disease and chronic lymphatic Leukaemia. Dan. Med. Bull. 4, 150 (1957)

45) KLAUS, D., H. H. HENNEMANN und L. BETHMANN:

Untersuchungen über die Katalase im Blut bei hämolytischen Anämien, Polycythämien und Panmyelopathien. Klin. Wschr. 38, 291 (1960)

46) KRESS, H. v.:

Die Leukämien im Rahmen allgemein pathologischer Probleme. Dtsch. Arch. klin. Med. 176, 359 (1934)

47) KÜNZER, W. und D. SCHNEIDER:

Zur Aktivität der reduzierenden Fermentsysteme in den Erythrozyten junger Säuglinge. Acta haemat. 9, 346 (1953)

- 48) KÜNZER, W., E. SCHÜTZ und E. AMBS:
Untersuchungen zur Heinz-Körperbildung in
Neugeborenen-Erythrozyten. Zur Aktivität der
Katalase im Neugeborenenblut.
Ztsch. f. Kinderheilk. 76, 48 (1955)
- 49) LAMBERS, K. und G. KLOSS:
Zur Erythropoese bei Leukämien unter beson-
derer Berücksichtigung hämolytischer Syndrome.
Ärztl. Wschr. 14, 710 (1959)
- 50) LASCH, F., W. MENTHE und G. SCHNEIDER:
Die Bedeutung der Bestimmung der Erythrozyten-
Lebensdauer für die Differentialdiagnose und
die Therapie der Anämien. Wien. klin. Wschr.
73, 289 (1961)
- 51) LETTERER, E.:
Beobachtungen an in die Bauchhöhle implantier-
ten Leberstückchen.
Verh. dtsh. path. Ges. 27, 254 (1934)
- 52) LÖHR, G. W. und H. D. WALLER:
Zellstoffwechsel und Zellalterung.
Klin. Wschr. 37, 833 (1959)
- 53) LÖHR, G. W. und H. D. WALLER:
Biochemie und Pathogenese der enzymopenischen
hämolytischen Anämien.
Dtsch. med. Wschr. 86, 27 und 87 (1961)
- 54) MASSHOFF, W. und W. GRANER:
Zur biologischen Bewertung von Ergüssen.
Klin. Wschr. 27, 730 (1949)
- 55) MIESCHER, P., O. GSELL und B. FUST:
Zur Pathogenese der Anämie bei Tuberkulose.
Schweiz. med. Wschr. 85, 917 (1955)
- 56) MOLLISON, P. L.:
Measurement of survival and destruction of
red cells in haemolytic syndromes.
Brit. med. Bull. 15, 59 (1959)

- 57) MOLLISON, P. L. and N. VEALL:
The use of the isotope Cr⁵¹ as a label for
red cells. Brit. J. Haemat. 1, 62 (1955)
- 58) MORENZ, J. und W. KEITEL:
Zum Krankheitsbild der erworbenen hämolytischen
Anämie. Ärztl. Wschr. 13, 781 (1958)
- 59) MÜLLER, U.:
zit. nach 28)
- 60) NECHELES, T. F., J. M. WEINSTEIN and G. V. LE ROY:
zit. nach 69)
- 61) OETTGEN, H. F. und M. KINDLER:
Die chronische erworbene hämolytische Anämie.
Fol. haemat. N. F. 4, 22 (1959)
- 62) PAPPENHEIM, A.:
Bemerkungen über Leukanämie, im Anschluß an
vorstehende Mitteilung von H. HIRSCHFELD.
Fol. haemat. 3, 339 (1906)
- 63) PASCHKIS, K.:
Über atypische hämolytische Anämien.
Ztschr. f. klin. Med. 105, 301 (1927)
- 64) PILLEMER, L., L. BLUM, I. H. LEPOW, O. A. ROSS,
E. W. TODD and A. C. WARDLAW:
The Properdin System and Immunity: Demonstra-
tion and Isolation of a New Serum Protein,
Properdin, and its Role in Immune Phenomena.
Science 120, 279 (1954)
- 65) PONDER, E.:
Certain Hemolytic Mechanisms in Hemolytic
Anemia. Blood 6, 559 (1951)
- 66) PRANKERD, T. A. J.:
The Metabolism of the Human Erythrocyte:
A Review. Brit. J. Haemat. 1, 131 (1955)

- 67) FRANKERD, T. A. J. and K. I. ALTMAN:
The effect of adenosine on the phosphate exchange in mammalian red blood cells.
Biochim. biophys. Acta 15, 158 (1954)
- 68) FRANKERD, T. A. J. and K. I. ALTMAN:
A study of the metabolism of phosphorus in mammalian red cells. Biochem. J. 58, 622 (1954)
- 69) PRIBILLA, W.:
Hämatologische Diagnostik mit radioaktiven Isotopen. Die Medizinische J. 1959 S. 1332
- 70) PRIBILLA, W., W. ERNST und W. RÖTTGEN:
Hämatologische Untersuchungen mit radioaktivem Chrom. Klin. Wschr. 37, 23 (1959)
- 71) REIMER, E. E. und K. STATTMANN:
Anämien bei Nierenkrankheiten.
Wien. klin. Wschr. 109, 83 (1959)
- 72) RÖSSLE, R.:
Über die seröse Entzündung der Organe.
Virch. Arch. 311, 252 (1944)
- 73) ROSS, J. F., C. L. CROCKETT and C. P. EMERSON:
The Mechanism of Anemia in Leukemia and Malignant Lymphoma. J. clin. Invest. 30, 668 (1951)
- 74) SCHEITLIN, W. und P. FRICK:
Erythrozyten-Überlebenszeit-Bestimmungen mit der Cr⁵¹-Methode bei hämolytischen Anämien unter Therapie. Schweiz. med. Wschr. 89, 1328 (1959)
- 75) SCHLEGEL, B. und H. BÖTTNER:
Untersuchungen zur Lebensdauer transfundierter Erythrozyten bei kranken Menschen.
Klin. Wschr. 29, 525 (1951)
- 76) SCHLEGEL, B., H. BÖTTNER und K. DUMKE:
Zur Hämolysebereitschaft des alternden Erythrozyten. Med. Klin. 47, 804 (1952)

- 77) SCHLEGEL, B. und H. BÖTTNER:

Ein Beitrag zur Frage der Anpassungsfähigkeit
der Erythrozyten gegenüber gesteigerten Abbau-
vorgängen im eigenen krankhaften Milieu.
Klin. Wschr. 30, 178 (1952)

- 78) SCHLEGEL, B. und P. KAPPEST:

Untersuchungen zur intravitalen Erythrocytolysse.
Klin. Wschr. 37, 805 (1956)

- 79) SCHMIDT, H. A. E. und W. KEIDERLING:

Die Lebenszeit Cr⁵¹-markierter Erythrocyten
bei hämatologischen Krankheitsbildern vor und
nach Splenektomie. Klin. Wschr. 38, 309 (1960)

- 80) SCHMIDT, H. A. E., W. KEIDERLING und W. FEISER:

Die Lebenszeit Cr⁵¹-markierter Erythrocyten
bei hämatologischen und infektiösen Krank-
heitsbildern. Pol. haemat. N. F. 6, 261 (1961)

- 81) SCHMIDT, H. A. E., H. SCHMITT, W. KEIDERLING,

M. MATTHES und W. FEISER:

Die Radiochrommarkierung als Mittel zur Wer-
tigkeitsbestimmung von Blutkonserven.
Acta haemat. 23, 96 (1960)

- 82) SCHÜRMANN, P.:

Über die Entstehung der Infarktnekrose.
Verh. dtsh. path. Ges. 29, (Breslau) 234 (1936)

- 83) SINGER, K.:

Über das hämolytisch-anämische Syndrom als
klinische Erscheinungsform des Lymphogranuloms.
Med. Klin. 32, 179 (1936)

- 84) TERBRÜGGEN, A.:

Über den Einfluß des Blutserums auf die Nekro-
biose. Beitr. path. Anat. 98, 264 (1936)

- 85) TÖNNIS, W. und A. BRUSIS:

Veränderungen des morphologischen Blutbildes
bei akuter und chronischer Darminhaltstauung.
(Ein Beitrag zur intestinalen Autointoxikation.)
Dtsch. Ztschr. Chir. 233, 133 (1933)

86) VOGEL, K. H.:

Anämie bei chronischer Niereninsuffizienz.
Die Medizinische. J. 1957, S. 110

87) WASSERMAN, L. R., D. STATS, L. SCHWARTZ and
H. FUDENBERG:

Symptomatic and Hemopathic Hemolytic Anemia.
Amer. J. Med. 18, 961 (1955)

88) WEINREICH, J.:

Die Indikation zur Splenektomie bei hämo-
lytischen Anämien. In: "Hämolyse und hämo-
lytische Erkrankungen". 7. Freiburger Sym-
posion. Springer-Verlag (1961)

89) WETHERLEY-MEIN, G., I. S. EPSTEIN, W. D. FOSTER
and A. J. GRIMES:

Mechanisms of Anaemia in Leukaemia.
Brit. J. Haemat. 4, 281 (1958)

An dieser Stelle danke ich Herrn Professor
Dr. med. H. F i s c h e r für die Überlassung des
Themas sowie für die Förderung und Beratung bei der
Anfertigung der Arbeit.

Lebenslauf.

Am 7. August 1930 wurde ich als vierter Sohn des Bauern Paul G r a b i s c h und seiner Ehefrau Anna, geb. Stein in K a r b i s c h a u Kreis Falkenberg (Oberschlesien) geboren. Nach vierjährigem Besuch der Volksschule trat ich 1940 in das humanistische Burg-Gymnasium zu O p p e l n ein. Als Obertertianer mußte ich im Januar 1945 in Folge der Kriegsereignisse die Schulausbildung abbrechen.

Nach der Vertreibung aus der Heimat verdiente ich mir bis 1948 meinen Lebensunterhalt als Gehilfe in der Landwirtschaft, anschließend fast viereinhalb Jahre als Briefträger bei der Deutschen Post. In dieser Zeit bereitete ich mich auf das Abitur vor, das ich nach Besuch der Reifeprüfungslehrgänge für Berufstätige am 17. März 1954 im Goethe-Gymnasium zu F r a n k f u r t /Main ablegte.

Mit dem Sommersemester 1954 begann ich das Studium der Medizin an der Johann Wolfgang Goethe-Universität zu F r a n k f u r t /Main. Nach bestandenen Physikum studierte ich die beiden ersten klinischen Semester an der Ruprecht Karl-Universität in H e i d e l b e r g , die restlichen vier wieder in Frankfurt /Main, wo ich am 15. Februar 1960 das medizinische Staatsexamen beendete.

Seit dem 1. April 1960 bin ich als Medizinal-Assistent tätig.

